

# Vergleichende Lokalisation der Homospermidin-Synthase, Eingangsenzym der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese, in verschiedenen Vertretern der Boraginaceae

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Daniel Heiko Niemüller  
aus Osterholz-Scharmbeck

1. Referent: Prof. Dr. Dietrich Ober  
2. Referent: Prof. Dr. Ludger Beerhues  
eingereicht am: 21.03.2007  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 13.07.2007  
2007  
(Druckjahr)

### **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Anke, S., Niemüller, D., Moll, S., Hänsch, R., Ober, D.: Polyphyletic Origin of Pyrrolizidine Alkaloids within the Asteraceae. Evidence from Differential Tissue Expression of Homospermidine Synthase. *Plant Physiology* 136, 4037-4047 (2004)

### **Tagungsbeiträge**

Niemüller, D., Reimann, A., Ober, D.: The Polyphyletic Origin of Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis - Comparative Localisation of Homospermidine Synthase within Boraginaceae. Botanikertagung 2004, Braunschweig, 05.-10.09.2004

Niemüller, D., Ober, D.: Die vergleichende Lokalisation der Homospermidinsynthase (HSS) in verschiedenen Vertretern der Boraginaceen. 4. Vortragstagung der Sektion Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Kaub am Rhein, 16.-18.03.2005



## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gebührt:

Herrn Prof. Dr. Dietrich Ober, der mir die Arbeit an diesem spannenden Thema ermöglicht und meine Arbeit stets mit Rat und anregenden Diskussionen bis zum erfolgreichen Ende begleitet hat.

Herrn Prof. Dr. Thomas Hartmann für die Möglichkeit zur Mitarbeit an seinem Institut und das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ludger Beerhues für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Robert Hänsch für die geduldige Einführung in die Techniken der Elektronenmikroskopie sowie die konstruktive Diskussion der Ergebnisse.

Frau Dr. Stefanie Moll und Herrn Dr. Sven Anke für die intensive Einführung in die immunologischen und mikroskopischen Methoden im Rahmen meines Pharmaziepraktikums.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie der TU-Braunschweig möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit und das über die Jahre angenehme Arbeitsklima. Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle die gute Stimmung in unserem „Männerbüro“, die humorvoll über so manchen Rückschlag im Labor hinweggeholfen hat.

Weiterhin danke ich meiner Familie, die mich immer großzügig in allen Dingen unterstützt hat.

Besonderer Dank gebührt schließlich Frau Wiebke Krüger, die mich immer wieder motiviert und mit Ihrer Geduld und Ausdauer den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit maßgeblich mitgetragen hat.



# Inhaltsverzeichnis

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| <b>Abbildungsverzeichnis</b> | <b>V</b> |
|------------------------------|----------|

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| <b>Tabellenverzeichnis</b> | <b>VII</b> |
|----------------------------|------------|

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Die Pyrrolizidin-Alkaloide als typische pflanzliche Sekundärstoffe . . . . .          | 2         |
| 1.1.1 Orte der Biosynthese . . . . .  | 4         |
| 1.1.2 Verteilung und Speicherung der PAs in der Pflanze . . . . .                         | 4         |
| 1.1.3 Toxizität der PAs . . . . .   | 5         |
| 1.1.4 Chemische Ökologie . . . . .  | 6         |
| 1.2 Die Homospermidinsynthese - das Eingangsenzym der PA-Biosynthese . . . . .            | 7         |
| 1.2.1 Reaktionsmechanismus der HSS . . . . .  | 7         |
| 1.2.2 Evolution der HSS . . . . .   | 8         |
| 1.3 Problemstellung . . . . .   | 13        |
| <b>2 Material und Methoden</b>  | <b>14</b> |
| 2.1 Chemikalien, Kits, Enzyme und spezielle Materialien . . . . .                         | 14        |
| 2.2 Pflanzenmaterial . . . . .  | 14        |
| 2.3 Molekularbiologische Techniken . . . . .  | 16        |
| 2.3.1 Klonierung und Expression von 6xHis-Tag markierten Proteinen . . . . .              | 16        |
| 2.3.1.1 Einführung des 6xHis-Tag-Motives durch PCR . . . . .                              | 16        |
| 2.3.2 Agarose Gelelektrophorese von Nucleinsäuren . . . . .                               | 17        |
| 2.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren . . . . .   | 19        |
| 2.3.3.1 Klonierung . . . . .  | 20        |
| 2.3.4 Transformation . . . . .  | 22        |
| 2.3.4.1 Herstellen kompetenter Zellen . . . . .   | 22        |
| 2.3.4.2 Transformation kompetenter Zellen . . . . .                                       | 22        |
| 2.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .  | 24        |
| 2.3.6 Heterologe Expression in <i>E. coli</i> . . . . .                                   | 26        |
| 2.4 Proteinchemische Methoden . . . . .   | 27        |
| 2.4.1 Quantifizierung, Umpufferung, Aufkonzentrierung und Fällung von Proteinen . . . . . | 27        |
| 2.4.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .              | 29        |
| 2.4.3 Proteinfärbungen . . . . .  | 30        |
| 2.4.3.1 Coomassie Färbung . . . . .   | 30        |
| 2.4.3.2 Indian-Ink Färbung . . . . .  | 31        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.4.4    | Reinigung der rekombinanten HSS und DHS über Metallchelatchromatographie . . . . .                         | 31        |
| 2.4.4.1  | Gewinnung des rekombinanten Proteins . . . . .   | 32        |
| 2.4.4.2  | Ni-Affinitätschromatographie . . . . .   | 32        |
| 2.4.4.3  | Co-Affinitätschromatographie . . . . .   | 33        |
| 2.5      | Immunologische und mikroskopische Techniken . . . . .  | 34        |
| 2.5.1    | Immunisierung . . . . .  | 34        |
| 2.5.2    | Affinitätsreinigung der Antikörper über CNBr-aktivierte Sepharose mit immobilisiertem Protein . . . . .    | 35        |
| 2.5.3    | Western Blot . . . . .   | 36        |
| 2.5.3.1  | Isolierung von löslichem Gesamtprotein . . . . .   | 37        |
| 2.5.3.2  | Semi-Dry Elektroblob . . . . .   | 37        |
| 2.5.3.3  | Detektion, Exposition und Dokumentation . . . . .  | 38        |
| 2.5.4    | Dotblot . . . . .  | 39        |
| 2.5.5    | Präparation und Immunodetektion von Kunstharschnitten . . . . .  | 40        |
| 2.5.5.1  | Fixierung der pflanzlichen Gewebe . . . . .  | 40        |
| 2.5.5.2  | Einbettung in Technovit 7100 für die Lichtmikroskopie . . . . .  | 41        |
| 2.5.5.3  | Einbettung in Unicryl für die Elektronenmikroskopie . . . . .  | 42        |
| 2.5.5.4  | Schneiden der Gewebeblöckchen . . . . .  | 43        |
| 2.5.5.5  | FITC-Markierung für die Fluoreszenzmikroskopie . . . . .   | 43        |
| 2.5.5.6  | Immunogold-Markierung für die Lichtmikroskopie . . . . .   | 45        |
| 2.5.5.7  | Immunogold-Markierung für die Elektronenmikroskopie . . . . .  | 45        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>47</b> |
| 3.1      | Gewebespezifische Expression der HSS in <i>Cynoglossum officinale</i> . . . . .                            | 47        |
| 3.1.1    | Reinigung der rekombinanten HSS und DHS aus <i>Cynoglossum officinale</i> . . . . .                        | 48        |
| 3.1.2    | Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die DHS im Western Blot . . . . .       | 49        |
| 3.1.3    | Expressionsanalyse durch Western Blot . . . . .  | 50        |
| 3.1.3.1  | Untersuchung von Keimlingen durch Western Blot . . . . .   | 53        |
| 3.1.4    | Immunolokalisation der HSS auf zellulärer Ebene in den Wurzeln von <i>Cynoglossum officinale</i> . . . . . | 56        |
| 3.1.4.1  | Kontrollversuche zur Spezifität der Markierung . . . . .   | 63        |
| 3.2      | Gewebespezifische Expression der HSS in <i>Symphytum officinale</i> . . . . .                              | 66        |
| 3.2.1    | Reinigung der rekombinanten HSS und DHS aus <i>Symphytum officinale</i> . . . . .                          | 66        |
| 3.2.2    | Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die DHS im Western Blot . . . . .       | 67        |
| 3.2.3    | Expressionsanalyse durch Western Blot . . . . .  | 68        |
| 3.2.3.1  | Expressionsanalyse der HSS im jungen Blatt . . . . .   | 70        |



|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.2.4    | Immunolokalisation der HSS auf zellulärer Ebene in den Wurzeln von <i>Symphytum officinale</i> . . . . .  | 72         |
| 3.2.5    | Immunolokalisation der HSS auf zellulärer Ebene im jungen Blatt von <i>Symphytum officinale</i> . . . . . | 75         |
| 3.2.5.1  | Kontrollversuche zur Spezifität der Markierung von <i>S. officinalis</i> Wurzeln . . . . .                | 76         |
| 3.3      | Gewebespezifische Expression der HSS in <i>Heliotropium indicum</i> . . . . .                             | 79         |
| 3.3.1    | Reinigung der rekombinanten HSS und DHS aus <i>Heliotropium indicum</i> . . . . .                         | 79         |
| 3.3.2    | Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die DHS im Western Blot . . . . .      | 80         |
| 3.3.3    | Expressionsanalyse durch Western Blot . . . . .   | 81         |
| 3.3.3.1  | Untersuchung der HSS-Expression in verschiedenen Blattstadien von <i>H. indicum</i> . . . . .             | 83         |
| 3.3.4    | Immunolokalisation der HSS in den jungen Blättern von <i>Heliotropium indicum</i> . . . . .               | 86         |
| 3.3.5    | Kontrollversuche zur Spezifität der Markierung . . . . .  | 88         |
| 3.3.6    | Immunolokalisation der HSS im jungen Sproß von <i>Heliotropium indicum</i> . . . . .                      | 92         |
| 3.3.7    | Kontrollversuche zur Spezifität der Markierung . . . . .  | 94         |
| 3.3.8    | Subzelluläre Lokalisation . . . . .   | 96         |
| 3.4      | Gewebespezifische Expression der HSS in <i>Senecio jacobaea</i> . . . . .                                 | 99         |
| 3.4.1    | Reinigung der rekombinanten HSS und DHS aus <i>Senecio jacobaea</i> . . . . .                             | 99         |
| 3.4.2    | Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die DHS im Western Blot . . . . .      | 100        |
| 3.4.3    | Expressionsanalyse durch Western Blot . . . . .   | 101        |
| 3.4.4    | Immunolokalisation der HSS auf zellulärer Ebene in den Wurzeln von <i>Senecio jacobaea</i> . . . . .      | 104        |
| 3.4.5    | Kontrollversuche zur Spezifität der Markierung . . . . .  | 110        |
| 3.4.6    | Proteolytische Spaltung der HSS als Artefakt bei Western Blots . . . . .                                  | 110        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b> . . . . .   | <b>115</b> |
| 4.1      | Vergleich der Expressionsmuster der HSS . . . . .   | 116        |
| 4.1.1    | Kreuzreaktivität des HSS-Antikörpers mit der DHS . . . . .  | 116        |
| 4.1.2    | Abbau der HSS . . . . .   | 118        |
| 4.1.3    | Vergleich RT-PCR und Western Blot . . . . .   | 120        |
| 4.1.4    | <i>Cynoglossum officinale</i> . . . . .   | 122        |
| 4.1.5    | <i>Symphytum officinale</i> . . . . .   | 126        |
| 4.1.6    | <i>Heliotropium indicum</i> . . . . .   | 128        |
| 4.1.7    | <i>Senecio jacobaea</i> . . . . .   | 130        |
| 4.1.8    | Vergleich der HSS-Expression mit anderen Enzymen des Sekundärstoffwechsels . . . . .                      | 131        |

|          |                        |            |
|----------|------------------------|------------|
| 4.2      | Ausblick . . . . .     | 139        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung</b> | <b>141</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.1  | Die 5 Grundstrukturen der PAs . . . . .  | 3  |
| 1.2  | Vergleich der Reaktionsmechanismen von Desoxyhypusin-Synthase und Homospermidin-Synthase . . . . .   | 9  |
| 1.3  | Vergleich der Immunomarkierung der HSS in den Wurzelquerschnitten von <i>S. vernalis</i> und <i>E. cannabinum</i> . . . . .                    | 12 |
| 2.1  | Aufbau Western Blot . . . . .  | 38 |
| 3.1  | Aufreinigung der rekombinanten HSS und DHS aus <i>C. officinale</i> . . . . .  | 49 |
| 3.2  | Spezifitätsanalyse des HSS-Antikörpers gegen die HSS und DHS aus <i>C. officinale</i> im Western Blot . . . . .                                | 51 |
| 3.3  | Western Blot verschiedener Gewebe von <i>C. officinale</i> . . . . .   | 52 |
| 3.4  | Western Blot zur Expressionsanalyse der Keimlinge von <i>C. officinale</i> . . . . .   | 55 |
| 3.5  | FITC-markierter Wurzelquerschnitt einer jungen, weißen Wurzel von <i>C. officinale</i> . . . . .   | 57 |
| 3.6  | FITC Markierung in den jungen, weißen Wurzeln von <i>C. officinale</i> in Abhängigkeit vom Grad der Differenzierung . . . . .                  | 59 |
| 3.7  | Immunogold-Markierung einer jungen Wurzel von <i>C. officinale</i> . . . . .   | 60 |
| 3.8  | FITC-Markierung einer jungen Wurzel von <i>C. officinale</i> im Bereich der Zellteilungszone . . . . .   | 61 |
| 3.9  | Expressionsmuster der HSS in der jungen Wurzel von <i>C. officinale</i> . . . . .  | 62 |
| 3.10 | Ausschnitte von FITC-markierten Wurzelquerschnitten von <i>C. officinale</i> aus den Kontrollversuchen zur Spezifität der Markierung . . . . . | 65 |
| 3.11 | Aufreinigung der rekombinanten HSS und DHS aus <i>S. officinale</i> . . . . .  | 67 |
| 3.12 | Spezifitätsanalyse des HSS-Antikörpers gegen die HSS und DHS aus <i>C. officinale</i> im Western Blot . . . . .                                | 69 |
| 3.13 | Western Blot verschiedener Gewebe von <i>S. officinale</i> . . . . .   | 70 |
| 3.14 | Western Blot zur Untersuchung der HSS-Expression in den jungen Blättern von <i>S. officinale</i> . . . . .                                     | 72 |
| 3.15 | AlexaFluor <sup>®</sup> 488-markierter Wurzelquerschnitt von <i>S. officinale</i> . . . . .  | 74 |
| 3.16 | AlexaFluor <sup>®</sup> 488-markierter Querschnitt durch ein junges Blatt von <i>S. officinale</i> . . . . .                                   | 76 |
| 3.17 | Ausschnitte von FITC-markierten Wurzelquerschnitten von <i>S. officinale</i> aus den Kontrollversuchen zur Spezifität der Markierung . . . . . | 78 |
| 3.18 | Aufreinigung der rekombinanten HSS und DHS aus <i>H. indicum</i> . . . . .   | 80 |

|      |   |     |
|------|---|-----|
| 3.19 | Spezifitätsanalyse des HSS-Antikörpers gegen die HSS und DHS aus <i>H. indicum</i> im Western Blot . . . . .  | 82  |
| 3.20 | Schema einer <i>H. indicum</i> Pflanze. . . . .   | 83  |
| 3.21 | Western Blot verschiedener Gewebe von <i>H. indicum</i> . . . . .   | 84  |
| 3.22 | Western Blot zur Untersuchung der HSS-Expression in verschiedenen Blattstadien von <i>H. indicum</i> . . . . .  | 85  |
| 3.23 | FITC-markierter Querschnitt durch ein junges Blatt von <i>H. indicum</i> . . . . .  | 87  |
| 3.24 | Querschnitt durch den Blattstiel von <i>H. indicum</i> in der Übersicht und im Detail . . . . .   | 89  |
| 3.25 | Ausschnitte von FITC-markierten Blattquerschnitten von <i>H. indicum</i> aus den Kontrollversuchen zur Spezifität der Markierung . . . . .  | 91  |
| 3.26 | Querschnitt durch den jungen Sproß von <i>H. indicum</i> in der Übersicht und im Detail . . . . .   | 93  |
| 3.27 | Ausschnitte von FITC-markierten Sproßquerschnitten von <i>H. indicum</i> aus den Kontrollversuchen zur Spezifität der Markierung . . . . .  | 95  |
| 3.28 | TEM-Aufnahme eines Immunogold-markierten jungen Sprosses von <i>H. indicum</i> im Querschnitt . . . . .   | 97  |
| 3.29 | Aufreinigung der rekombinanten HSS und DHS aus <i>S. jacobaea</i> . . . . .   | 100 |
| 3.30 | Spezifitätsanalyse des HSS-Antikörpers gegen die HSS und DHS von <i>S. jacobaea</i> im Western Blot . . . . .   | 102 |
| 3.31 | Western Blot verschiedener Gewebe von <i>S. jacobaea</i> . . . . .  | 103 |
| 3.32 | AlexaFluor® 488-markierter Querschnitt durch die Wurzel von <i>S. jacobaea</i> in der Übersicht und im Detail . . . . .   | 106 |
| 3.33 | Immunogold-markierter Querschnitt durch die Wurzel von <i>S. jacobaea</i> in der Übersicht und im Detail . . . . .  | 108 |
| 3.34 | Längsschnitt durch die Wurzel von <i>S. jacobaea</i> . . . . .  | 109 |
| 3.35 | Ausschnitte von FITC-markierten Blattquerschnitten von <i>S. jacobaea</i> aus den Kontrollversuchen zur Spezifität der Markierung . . . . .   | 111 |
| 3.36 | Western Blot zur Untersuchung eines Abbaus der HSS von <i>S. jacobaea</i> . . . . .   | 113 |
| 4.1  | „Unrooted Maximum Likelihood Tree“ basierend auf 23 cDNA-Sequenzen, die für die DHS und HSS von verschiedenen Arten der Angiospermen kodieren . . . . .                               | 117 |
| 4.2  | Vergleich der Expressionsmuster der HSS auf Gewebe- und zellulärer Ebene bereits untersuchter Vertreter aus den Familien der Asteraceae, Boraginaceae und Orchidaceae Teil 1. . . . . | 137 |
| 4.3  | Vergleich der Expressionsmuster der HSS auf Gewebe- und zellulärer Ebene bereits untersuchter Vertreter aus den Familien der Asteraceae, Boraginaceae und Orchidaceae Teil 2. . . . . | 138 |

## Tabellenverzeichnis

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 2.1 | Primertabelle zur Neuklonierung der 6xHis-Tag Proteine . . . . .   | 18  |
| 3.1 | Ergebnis der Auszählung der Goldpartikel in jeweils drei zufällig gewählten Sichtfeldern unter dem Elektronenmikroskop . . . . . | 98  |
| 4.1 | Vergleich der gewebespezifischen Transkription und Expression der HSS in den untersuchten Vertretern der Boraginaceae . . . . .  | 123 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                       |                                      |
|-----------------------|--------------------------------------|
| <i>A. belladonna</i>  | <i>Atropa belladonna</i>             |
| abs.                  | absolut                              |
| APS                   | Ammoniumpersulfat                    |
| bp                    | Basenpaar                            |
| BIA                   | Benzylisochinolin-Alkaloid           |
| BS                    | Bündelscheide                        |
| BSA                   | Rinderserumalbumin                   |
| cDNA                  | komplementäre DNA                    |
| CNBr                  | Cyanbromid                           |
| CO                    | Cortex                               |
| <i>C. officinale</i>  | <i>Cynoglossum officinale</i>        |
| <i>C. roseus</i>      | <i>Catharanthus roseus</i>           |
| CS                    | Casparyscher Streifen                |
| Dhyp                  | Desoxyhypusin                        |
| DHS                   | Desoxyhypusin-Synthase               |
| DIC                   | Differentialinterferenzkontrast      |
| DNA                   | Desoxyribonukleinsäure               |
| dNTP                  | desoxy-Nukleosidtriphosphat          |
| DOC                   | Desoxycholat                         |
| EDTA                  | Ethylendiaminotetraacetat            |
| eIF5A                 | eukaryontischer Initiationsfaktor 5A |
| EC                    | „Enzyme Commission“                  |
| <i>E. coli</i>        | <i>Escherichia coli</i>              |
| <i>E. cannabinum</i>  | <i>Eupatorium cannabinum</i>         |
| EN                    | Endodermis                           |
| EP                    | Epidermis                            |
| EX                    | Exodermis                            |
| FITC                  | Fluoresceinisothiocyanat             |
| GUS                   | $\beta$ -Glucuronidase               |
| <i>H. indicum</i>     | <i>Heliotropium indicum</i>          |
| <i>H. spathulatum</i> | <i>Heliotropium spathulatum</i>      |
| His                   | Histidin                             |
| <i>H. niger</i>       | <i>Hyoscyamus niger</i>              |
| H6H                   | Hyoscyamin 6 $\beta$ -Hydroxylase    |

**Fortsetzung**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| HSS                       | Homospermidin-Synthase                        |
| Hyp                       | Hypusin                                       |
| IgG                       | Immunglobulin G                               |
| IgM                       | Immunglobulin M                               |
| IPTG                      | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid    |
| kb                        | Kilobasenpaar                                 |
| kDa                       | Kilodalton                                    |
| LB                        | Luria-Bertani                                 |
| LG                        | Leitgewebe                                    |
| Lsg.                      | Lösung  |
| Lys                       | Lysin   |
| MIA                       | Monoterpen-Indol-Alkaloid                     |
| min.                      | mindestens                                    |
| mRNA                      | „messenger“-Ribonukleinsäure                  |
| MS-20                     | Murashige und Skoog-Medium                    |
| % (m/v)                   | Prozent Masse pro Volumen                     |
| MW                        | Molekulargewicht                              |
| Ni-NTA                    | Nickel-Nitrilo-Tri-Essigsäure (Chelatkomplex) |
| <i>N. tabacum</i>         | <i>Nicotiana tabacum</i>                      |
| NAD <sup>+</sup>          | Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form) |
| OD <sub>600</sub>         | Optische Dichte                               |
| PA                        | Pyrrolizidin-Alkaloid                         |
| PAGE                      | Polyacrylamid-Gelelektrophorese               |
| PBS                       | „Phosphate-buffered-saline“                   |
| PCR                       | Polymerase Kettenreaktion                     |
| PH                        | Phloem  |
| <i>Phalaenopsis</i> spec. | <i>Phalaenopsis</i> Species                   |
| PMSF                      | Phenylmethylsulfonylfluorid                   |
| PMT                       | Putrescin <i>N</i> -Methyltransferase         |
| PP                        | Palisadenparenchym                            |
| <i>P. somniferum</i>      | <i>Papaver somniferum</i>                     |
| PVDF                      | Polyvinylidendifluorid                        |
| PVP                       | Polyvinylpyrrolidon                           |
| PZ                        | Perizykel                                     |
| RH                        | Rhizodermis                                   |
| RNA                       | Ribonukleinsäure                              |
| RNase                     | Ribonuklease                                  |
| RP                        | Rindenparenchym                               |
| Upm                       | Umdrehung pro Minute                          |
| RT                        | reverse Transkription                         |
| SDS                       | Natriumdodecylsulfat                          |

**Fortsetzung**

|                      |   |
|----------------------|---|
| <i>S. jacobaea</i>   | <i>Senecio jacobaea</i>                   |
| SNO                  | Senecionin <i>N</i> -Oxygenase            |
| <i>S. officinale</i> | <i>Symphytum officinale</i>               |
| SP                   | Schwammparenchym                          |
| <i>S. vernalis</i>   | <i>Senecio vernalis</i>                   |
| SW                   | Seitenwurzel                              |
| SZ                   | Schließzelle                              |
| T                    | Trichom                                   |
| TA                   | Tropan-Alkaloid                           |
| TBE                  | Tris-Borat-EDTA-Puffer                    |
| TBS                  | „Tris-buffered-saline“                    |
| TBS/T                | „Tris-buffered-saline“ mit 0,1 % Tween 20 |
| TEM                  | Transmissions-Elektronen-Mikroskop        |
| TEMED                | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin          |
| <i>T. flavum</i>     | <i>Thalictrum flavum</i>                  |
| <i>T. jacobaeae</i>  | <i>Tyria jacobaeae</i>                    |
| TR I                 | Tropinonreduktase I                       |
| Tris                 | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan           |
| UV-Licht             | Ultraviolett-Licht                        |
| Vis-Licht            | sichtbares Licht                          |
| VT                   | Volumenteil                               |
| % (v/v)              | Prozent Volumen pro Volumen               |
| XY                   | Xylem                                     |
| ZW                   | Zellwand                                  |



# 1 Einleitung

Eine interessante und charakteristische Eigenschaft von Pflanzen ist die Fähigkeit zur Synthese einer enormen Vielfalt an chemischen Verbindungen, die neben ihrer Funktion für die Pflanzen zum Teil eine ausgeprägte Wirkung auf Tiere und damit auch auf den Menschen haben und als neue, pflanzliche Arzneimittel erschlossen werden können. Diese teilweise sehr komplexen Verbindungen, von denen bereits über 200.000 charakterisiert wurden, sind Teil des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Grundsätzlich kann der pflanzliche Stoffwechsel in Primär- und Sekundärstoffwechsel unterteilt werden, wobei der Primärstoffwechsel diejenigen Produkte und Prozesse umfasst, die unentbehrlich für das Wachstum, die Entwicklung und die Fortpflanzung des Organismus sind. Entsprechend seiner essentiellen Bedeutung unterliegt der Primärstoffwechsel einem hohen Selektionsdruck, der kaum Veränderungen im Verlauf der Evolution zulässt, weswegen er sowohl bei den ursprünglichsten als auch bei den höher entwickelten Organismen in fast gleicher Weise vorkommt, er ist also einheitlich und universell.

Der Sekundärstoffwechsel hingegen, der sich vor allem durch seine chemisch strukturelle Vielfalt auszeichnet, ist das sich ständig im Verlauf der Evolution verändernde Produkt einer stetigen Auseinandersetzung der Pflanze mit ihrer Umwelt. Über die Sekundärstoffe ist die auf Grund ihrer statischen Lebensweise an ihren Standort gebundene Pflanze in der Lage, mit ihrer Umwelt zu interagieren. So dienen diese Stoffe beispielsweise der Anlockung von Insekten zur Bestäubung oder zur Samenverbreitung, in Form toxischer Substanzen als Fraßschutz oder als Möglichkeit, sich an bestimmten extremen Standorten mit hohen Temperaturen oder Salzkonzentrationen zu behaupten (Pichersky und Gang, 2000; Harborne, 2001).

Die Produkte des Sekundärstoffwechsels stellen somit entgegen früherer Theorien keine Abfall- oder Nebenprodukte des Primärstoffwechsels dar (Mothes, 1955; Luckner, 1990). Ebenso handelt es sich bei ihnen nicht um Überschußprodukte des Primärstoffwechsels, die erst im weiteren Verlauf der Evolution eine Funktion erhalten haben (Haslam, 1986). Vielmehr ist der Sekundärstoffwechsel unter dem permanenten Selektionsdruck einer feindlichen Umwelt durch ständige Optimierung und Weiterentwicklung von nutz-

bringenden Sekundärstoffen hervorgegangen. Der Sekundärstoffwechsel ist somit im Gegensatz zum Primärstoffwechsel zwar entbehrlich für Wachstum und Entwicklung eines Organismus, jedoch ist er unentbehrlich für das Überleben einer Pflanze in ihrer Umwelt (Swain, 1977; Hartmann, 1985, 1996).

Eine sehr interessante und vielseitige Klasse von Sekundärstoffen stellen die Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) dar. Mit ihnen läßt sich eindrucksvoll belegen, daß der Sekundärstoffwechsel keinesfalls ein Produkt von Zufällen ist, sondern vielmehr die Grundlage für die Entwicklung eines streng selektierten Arsenal biologisch wirksamer Strukturen darstellt (Hartmann, 1987).

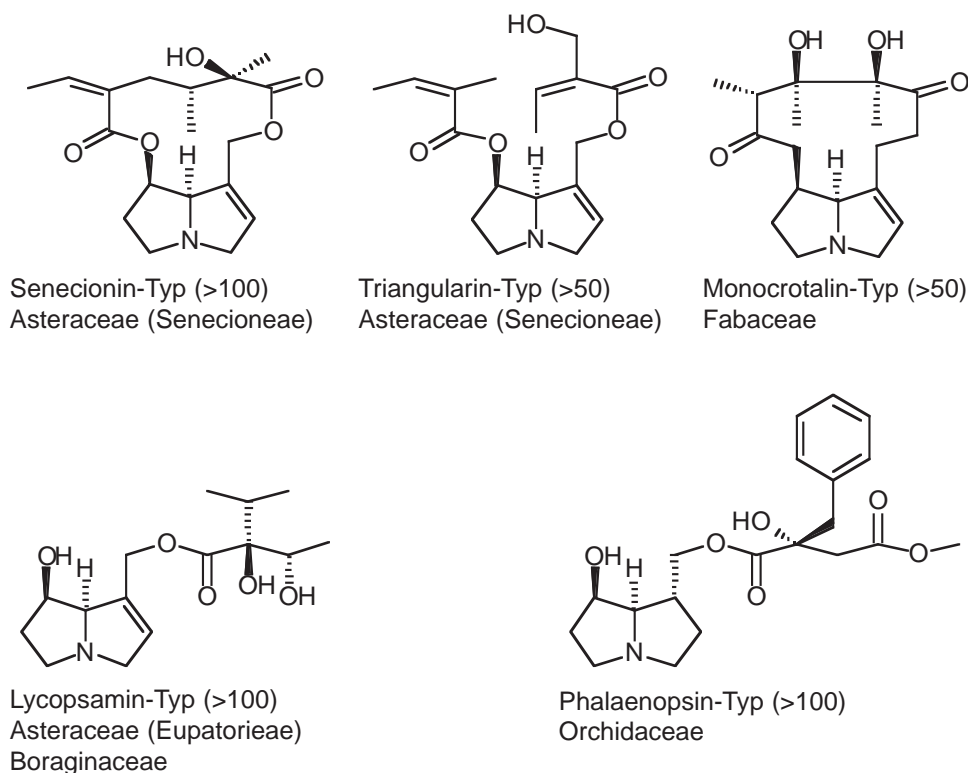
## 1.1 Die Pyrrolizidin–Alkaloide als typische pflanzliche Sekundärstoffe

PAs kommen innerhalb der Angiospermen verstreut in einigen nicht nahe miteinander verwandten Pflanzenfamilien vor. Ihr Hauptvorkommen (>95%) ist beschränkt auf die Familien der Asteraceae (Gattungsgruppen der Senecioneae und Eupatorieae), der Boraginaceae (mehrere Arten), der Orchidaceae (z.B. *Phalaenopsis* spec.) und der Fabaceae (hauptsächlich *Crotalaria* spec.). Vereinzelt kommen sie zudem innerhalb der Apocynaceae, der Celastraceae, Convolvulaceae, Ranunculaceae und Santalaceae vor (Hartmann und Witte, 1995).

Bei den PAs handelt es sich um Esteralkaloide. Sie bestehen aus einer Necinbase als Grundgerüst, die mit ein oder mehreren Necinsäuren verestert sein kann, wobei sowohl offenkettige Mono- und Diester sowie makrocyclische Diester entstehen können. Durch weitere chemische Modifikationen in Form von Ein- bis Zweischrittreaktionen (Hydroxylierungen, Epoxidierungen,...) an der Basen- und Säureneinheit entsteht das für die jeweilige Pflanze charakteristische PA-Bouquet. Trotz der großen Diversität lassen sich die mehr als 400 bereits bekannten Strukturen auf Grund biogenetischer Merkmale in fünf charakteristische Grundstrukturen einteilen (Abb. 1.1).

PAs können in zwei Formen vorkommen, als tertiäre PAs oder als PA-*N*-Oxid. In Form ihrer *N*-Oxide sind die PAs salzartig und wasserlöslich, womit sie sich in dieser Form sehr gut für den Transport und die Speicherung z.B. in der Vakuole der Pflanze eignen. Als polare Salze sind die *N*-Oxide nicht in der Lage passiv Membranen zu permeieren und somit untoxisch. Liegen die PAs hingegen als freie Base (tertiäre PAs) vor, sind sie

auf Grund ihrer lipophilen Eigenschaft membrangängig und werden somit im Darm von Herbivoren leicht resorbiert. Besitzen die resorbierten PAs dann noch ganz bestimmte Strukturmerkmale, so kommt es in der Leber durch Cytochrom P450-Monooxygenasen zur Bioaktivierung dieser protoxischen PAs (s. Kap. 1.1.3). Innerhalb der Asteraceen, Boraginaceen und Fabaceen liegen die PAs hauptsächlich in Form ihrer *N*-Oxide vor (Hartmann und Witte, 1995). In *Phalaenopsis spec.* (Orchidaceae) liegen sie nur teilweise als *N*-Oxide und in der Familie der Convolvulaceae als basische tertiäre Alkaloide vor (Frölich, 1996; Jenett-Siems et al., 1998). In den trockenen und wasserarmen Samen von *Crotalaria* (Fabaceae) liegen die PAs ebenfalls in ihrer basischen, tertiären Form gespeichert vor (Hartmann und Witte, 1995).



**Abbildung 1.1:** Die 5 Grundstrukturen der PAs nach Hartmann und Witte (1995). Die Zahlen in Klammern stehen für die bisher bekannten Einzelstrukturen.

### 1.1.1 Orte der Biosynthese

Die Synthese der PAs erfolgt innerhalb der verschiedenen Pflanzenfamilien in unterschiedlichen Organen. Tracerversuche an Organkulturen von Wurzeln sowie an intakten Pflanzen verschiedener Asteraceen ergaben, daß die PA-Biosynthese ausschließlich in der Wurzel lokalisiert ist (Toppel et al., 1987; Hartmann et al., 1989; Hartmann, 1994), wobei die Wurzelspitze in diesen Untersuchungen die höchste Biosyntheseaktivität aufwies. Da von der Wurzelspitze das Wachstum der Wurzel ausgeht, ist eine Kopplung der PA-Biosynthese an die Wachstumsaktivitäten der Wurzel wahrscheinlich (Sander und Hartmann, 1989). Möglicherweise spielt das als Wachstumsfaktor in Pflanzen diskutierte Spermidin in diesem Zusammenhang eine regulatorische Rolle (Hartmann et al., 1988; Graser und Hartmann, 2000).

Ein anderes, differenziertes Bild hinsichtlich der Lokalisation der PA-Biosynthese zeigt sich innerhalb der untersuchten Vertreter aus der Familie der Boraginaceae. Während bei der Untersuchung einzelner Pflanzenorgane bei *Symphytum officinale* bisher nur in Wurzelorgankulturen PA-Biosynthese nachgewiesen werden konnte (Frölich, 1996), zeigte bei *Heliotropium indicum* und *Heliotropium spathulatum* das gesamte Sproßsystem die Fähigkeit zur Synthese von PAs, wobei die höchste Aktivität in den jungen Blättern nachgewiesen wurde (Birecka und Catalfamo, 1982; Frölich, 1996). Tracerexperimente an der einjährigen Rosettenpflanze von *Cynoglossum officinale* belegten hingegen eine PA-Biosynthese sowohl im isolierten Sproßsystem als auch in der isolierten Wurzel (Van Dam et al., 1995b).

Bei den Fabaceen in der Gattung *Crotalaria* lassen verschiedene Versuche darauf schließen, daß die PA-Biosynthese im Sproß lokalisiert ist (Nowacki und Byerrum, 1962; Hartmann, 1994). In der Orchidaceae *Phalaenopsis* spec. konnte die Synthese der PAs in der Luftwurzelspitze sowie eine Expression der HSS in der Knospe nachgewiesen werden (Frölich, 1996; Anke et al., 2004)).

### 1.1.2 Verteilung und Speicherung der PAs in der Pflanze

Die Funktion der PAs als effektiver Schutz vor Herbivorie spiegelt sich auch in der organ- und gewebespezifischen Verteilung der Alkaloide in den PA-führenden Pflanzen wieder. In *Senecio vulgaris* konnte über 80 % der Gesamtalkaloidmenge in den Blütenköpfchen gefunden werden. Damit lag die PA-Konzentration in den reproduktiven Organen um den Faktor 30 höher als in den übrigen vegetativen Organen (Hartmann und Zimmer,

1986). Auch in anderen untersuchten PA-führenden Pflanzen zeigte sich, daß die Blüten der Hauptspeicherort für die PAs sind, wohingegen die Konzentration der PAs in den übrigen Organen und Geweben innerhalb der verschiedenen Familien variieren kann (Van Dam et al., 1995a; Frölich, 1996).

Besonders genau untersucht wurde die Biosynthese und anschließende Distribution der PAs in der Pflanze *S. vulgaris*. Das ausschließlich in der Wurzel synthetisierte Senecionin-*N*-oxid wird über das Phloem in die oberirdischen Organe transportiert, wo es mit Hilfe weiterer, einfacher chemischer Modifizierungen in das artspezifische PA-Spektrum überführt wird. Für das Be- und Entladen des Phloems werden spezifische Carrier vermutet, da Pflanzen, die keine PAs führen nicht in der Lage sind, diese über das Phloem zu transportieren (Hartmann et al., 1989). Für den Transport der Alkaloide in die Vakuole wurden bereits entsprechende Carrier beschrieben (Ehmke et al., 1988). Die Speicherung der Alkaloide in der Vakuole erfolgt in Form ihrer *N*-Oxide. Die gebildeten PAs unterliegen keinem Abbau, sondern werden lediglich stetig weiter diversifiziert, ein weiterer Beleg für den großen Nutzen dieser fraßhemmenden Sekundärstoffe für die Pflanze (Sander und Hartmann, 1989; Hartmann und Dierich, 1998).

### 1.1.3 Toxizität der PAs

Das häufige Vorkommen tödlich verlaufender Intoxikationen von Weidevieh nach Aufnahme von PA-haltigen Pflanzen belegt eindrucksvoll die stark toxische Wirkung dieser Alkaloide (Fowler, 1983). Für diese Giftwirkung auf Wirbeltiere sind PAs mit einer Doppelbindung in 1,2-Position, einer veresterten allylischen Hydroxylgruppe an Position 9 und einer freien oder ebenfalls veresterten Hydroxylgruppe an Position 7 verantwortlich. Diese zunächst nicht giftigen, hydrophoben Verbindungen werden passiv resorbiert und in der Leber oder in der Lunge durch mikrosomale Cytochrom P-450-Monooxygenasen, die dem Organismus eigentlich der Entgiftung dienen, in instabile, alkylierende Pyrroliderivate bioaktiviert. Die Produkte dieser Giftungsreaktion reagieren alkylierend mit Proteinen und Nukleinsäuren, was geno- und cytotoxische Effekte zur Folge hat (Mattocks, 1986; Cheeke, 1988). Auch die in den Pflanzen primär als *N*-Oxide vorliegenden PAs sind potentiell toxisch, da sie nach Aufnahme im reduzierenden Milieu des Darms durch unspezifische Reduktion in die tertiäre Form umgewandelt werden können. Interessanterweise zeigen bestimmte Vertebraten wie z.B. Meerschweinchen und Hamster eine erhöhte Toleranz gegenüber einer Intoxikation mit PAs. Diese ist auf das Vorhandensein einer

mikrosomalen Multisubstrat-Flavin-Monooxygenase in der Leber zurückzuführen, die sehr effektiv das prätoxische tertiäre Alkaloid in das polare *N*-Oxid überführt, welches dann renal eliminiert werden kann (Miranda et al., 1991; Huan et al., 1998a,b).

#### 1.1.4 Chemische Ökologie

Die PAs wirken auch auf Insekten toxisch (Frei et al., 1992), da in ihnen eine ähnliche Giftungsreaktion der tertiären Alkaloide zu den reaktiven Pyrrolderivaten wie bei den Säugetieren abläuft (Hodgson, 1985). Jedoch ist es einigen Insekten im Verlauf einer Coevolution mit den PA-haltigen Pflanzen gelungen, die Toxizität der PAs zu überwinden und sich somit diese Pflanzen als exklusive Nahrungsquelle zu erschließen. Darüber hinaus haben sich bestimmte Insekten noch weiter an die PAs adaptiert, indem sie die PAs zu ihrem eigenen Schutz akkumulieren und in einigen Fällen sogar als Ausgangsstoff für die Produktion von Pheromonen einsetzen. (Boppré, 1986, 1995; Hartmann und Ober, 2000). Aus diesen Interaktionen von Pflanze und Insekt hat sich im Verlauf der Evolution ein sehr komplexes und dynamisches Gefüge entwickelt, wobei die Pflanzen stetig ihre Verteidigung optimieren und die Insekten auf der anderen Seite versuchen diese Verteidigung zu überwinden und einen eigenen Nutzen daraus zu ziehen. Diese in jüngster Zeit durchgeführten Untersuchungen zu den ökologischen Wechselwirkungen zwischen Pflanze und Insekt belegen auf faszinierende Art und Weise die wichtige biologische Funktion von PAs und anderen Sekundärstoffen in einem Ökosystem. Auf Grund der Komplexität der Thematik sei an dieser Stelle auf Reviews verwiesen (Hartmann und Ober, 2000; Ober, 2003).

Ein in unserer Arbeitsgruppe besonders gut untersuchtes Beispiel für die Nutzung von PAs durch Insekten zu ihrer eigenen Verteidigung ist der Arctiid *Tyria jacobaeae*. In seiner Hämolymphe konnte eine spezifische Flavin-abhängige-Monooxygenase gefunden werden, welche die passiv in die Hämolymphe resorbierten tertiären Alkaloide quantitativ in ihre *N*-Oxide überführt. Diese nicht toxischen PA-*N*-Oxide werden in der Hämolymphe gespeichert und als Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde eingesetzt (Lindigkeit et al., 1997). Seine daraus resultierende Wehrhaftigkeit signalisiert der Nachtfalter durch eine auffällige aposomatische Warnfärbung.

## 1.2 Die Homospermidinsynthese - das Eingangsenzym der PA-Biosynthese

Die Biosynthese der PAs ist eng mit dem Polyaminstoffwechsel verknüpft. Untersuchungen haben gezeigt, daß ihre Substrate aus dem Aminosäurestoffwechsel hervorgehen. Dabei stellen die Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin wichtige Vorstufen für die Necinsäuren dar (Robins, 1989). Als Starter für die Synthese der Necinbase konnten durch Tracerexperimente die symmetrischen Polyamine Putrescin, Spermidin und Homospermidin identifiziert werden (Robins, 1989). Putrescin, das auch Substrat für die Biosynthese von Spermidin ist, wird in *Senecio*-Arten nicht wie früher vermutet direkt über eine Decarboxylierung von Ornithin gebildet, sondern es entsteht ausschließlich über den Arginin/Agmatin-Weg (Hartmann et al., 1988).

Als erstes spezifisches Enzym der PA-Biosynthese konnte die Homospermidinsynthese (HSS, EC 2.5.1.45) in Wurzelkulturen von *Eupatorium* und *Senecio* identifiziert werden (Böttcher et al., 1993).

### 1.2.1 Reaktionsmechanismus der HSS

Die HSS überträgt in einer  $\text{NAD}^+$ -gekoppelten Reaktion den Aminobutylrest von einem Molekül Spermidin auf Putrescin als Akzeptor, wodurch das seltene Polyamin Homospermidin entsteht (Abb. 1.2 B). Homospermidin ist das erste spezifische Zwischenprodukt der PA-Biosynthese (Khan und Robins, 1985). Es unterliegt keinem Abbau, sondern wird vollständig in die Necinbase eingebaut, wodurch der HSS eine wichtige Schlüsselrolle an der Schnittstelle zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel zukommt, da sie den Fluß der Primärstoffe in die PA-Biosynthese kontrolliert (Rana und Robins, 1983; Böttcher et al., 1993). Spermidin oder eine homologe Verbindung ist dabei nach neueren Daten zwingend als Aminobutyl donor notwendig, da die pflanzliche HSS im Gegensatz zur bakteriellen HSS kein Putrescin als Donor der Aminobutyleinheit verwenden kann (Ober et al., 1996, 2003b). Eine HSS konnte auch in den Keimlingen von *Lathyrus sativus* nachgewiesen werden, die jedoch nur Homospermidin und keine PAs synthetisieren (Srivenugopal und Adiga, 1980).

Für die weitere Umwandlung des Homospermidins in das Necinbasengrundgerüst wird eine Diaminoxidase postuliert, die die beiden primären Aminogruppen oxidiert, so daß eine spontane Zyklisierung möglich wird (Rana und Robins, 1983). Die Hemmbarkeit

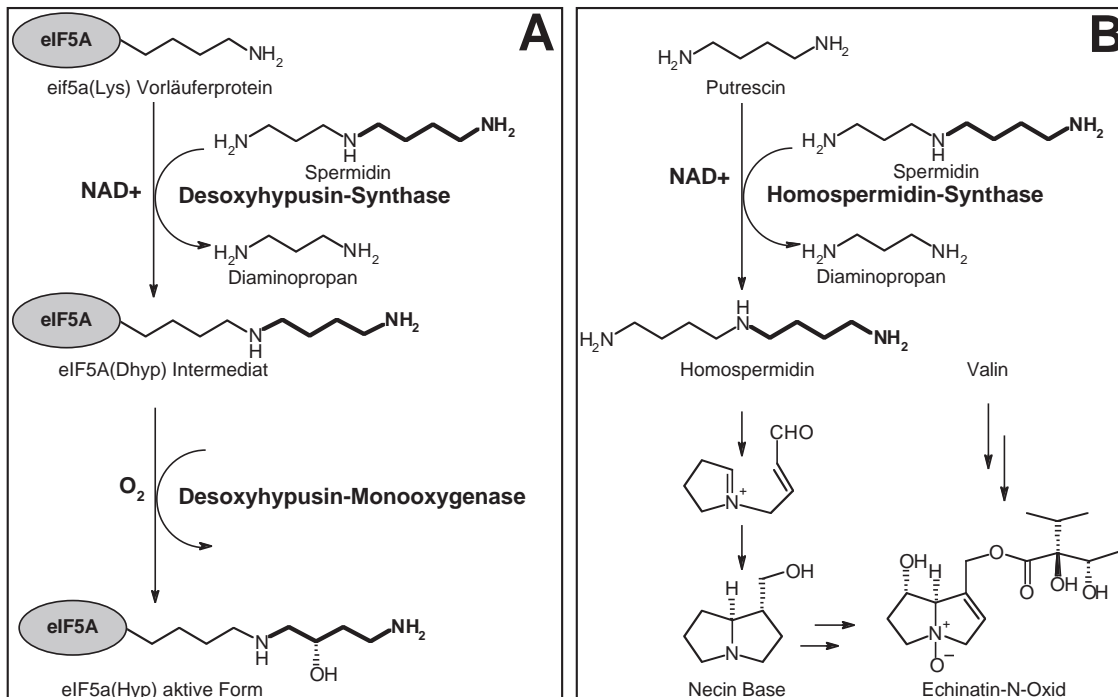
des dem Homospermidin folgenden Biosyntheseschrittes durch Zusatz des spezifischen Diaminoxidaseinhibitors Hydroxyethylhydrazin (HEH) untermauert diese Vermutung.

### 1.2.2 Evolution der HSS

Neben dem Vorkommen in Pflanzen konnte die HSS auch in bestimmten Bakterienarten nachgewiesen werden, die zu den  $\alpha$ -Proteobakterien gehören. Erste Vergleiche der kinetischen und physikalischen Daten der gereinigten nativen HSS aus *S. vernalis* und *E. cannabinum* mit der HSS aus dem Bakterium *Blastochloris viridis* (vormals: *Rhodopseudomonas viridis*, EC 2.5.1.44) ließen auf eine enge phylogenetische Verwandtschaft von pflanzlicher und bakterieller HSS schließen (Böttcher et al., 1994; Ober et al., 1996; Ober, 1997). Nach erfolgreicher Klonierung und Überexpression der HSS aus *S. vernalis* und *Blastochloris viridis* in *E. coli* zeigten die anschließenden vergleichenden Sequenzanalysen überraschenderweise keine Homologien auf Nuklein- und Aminosäureebene (Tholl et al., 1996; Ober und Hartmann, 1999b). Statt dessen zeigte die HSS aus *S. vernalis* bei Datenbankvergleichen eine hohe Sequenzidentität zur Desoxyhypusin-Synthase (DHS, EC 2.5.1.46), einem Enzym des Primärstoffwechsels ohne jeglichen Bezug zur PA-Biosynthese.

Die ubiquitär in Eukaryonten und Archaeobakterien vorkommende DHS katalysiert den ersten von zwei Schritten in der posttranslationalen Aktivierung des eukaryontischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A). Dabei wird in einer ebenfalls  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Reaktion ein Aminobutylrest von einem Molekül Spermidin auf einen spezifischen Lysinrest des eIF5A-Vorläuferproteins übertragen (Abb. 1.2 A). Das dabei entstandene Desoxyhypusin wird dann im zweiten Schritt der Aktivierung durch eine Desoxyhypusin-Monooxygenase (EC 1.14.99.29) zum proteingebundenen Hypusin hydroxyliert. Die genaue biologische Funktion des aktivierten eIF5A ist noch nicht vollständig verstanden, es konnte jedoch an Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) gezeigt werden, daß dieser Faktor für das Zellwachstum und die Zellproliferation essentiell ist (Park et al., 1997, 1998). Ein Fehlen des Faktors führte bei den untersuchten Hefezellen zu einem sofortigen Stopp des Wachstums. Eine Beteiligung des Faktors an der Proteinbiosynthese scheint jedoch entgegen früherer Vermutungen nicht essentiell zu sein, da in *S. cerevisiae* die Proteinbiosyntheserate nach dem Ausschalten des Faktors nur auf 70 % der ursprünglichen Wertes abnahm (Kang und Hershey, 1994). Neuere Studien implizieren eine Funktion dieses Faktors als Shuttle-Protein für das Ausschleusen bestimmter mRNAs aus dem Zellkern (Rosorius





**Abbildung 1.2: Vergleich der Reaktionsmechanismen von Desoxyhypusinsynthase (EC 2.5.1.46) und Homospermidinsynthase (EC 2.5.1.45).** Beide Enzyme übertragen in einer  $\text{NAD}^+$ -gekoppelten Reaktion den Aminobutylrest von einem Molekül Spermidin auf einen Akzeptor. Im Fall der DHS (A) ist dies ein spezifischer Lysinrest (Lys), der zu Desoxyhypusins (Dhyp) umgesetzt wird. In einem 2. Schritt wird das Desoxyhypusins zu Hypusins (Hyp) hydroxyliert, womit der Faktor eIF5A aktiviert ist. Die HSS (B) hingegen überträgt den Aminobutylrest auf ein Putrescinmolekül wobei Homospermidin entsteht. Das Homospermidin ist die Vorstufe zur Synthese der Necinbase, dem gemeinsamen Grundgerüst aller PAs, wie bspw. das Echinatin-N-Oxid.

et al., 1999). Eine Beteiligung des Faktors am Abbau von mRNAs wird ebenfalls diskutiert (Valentini et al., 2002).

HSS und DHS aus *S. vernalis* konnten heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Sie zeigten mit 79 % auf Aminosäureebene und 83 % auf Nukleinsäureebene eine sehr hohe Sequenzidentität. Auch die biochemischen Charakterisierungen ergaben ein hohes Maß an Übereinstimmung hinsichtlich ihrer physikalischen und kinetischen Parameter. Im Verlauf dieser Untersuchungen stellte sich interessanterweise heraus, daß die DHS als Nebenreaktion Spermidin und Putrescin mit der gleichen Aktivität wie die HSS zu Homospermidin umsetzen kann (Ober und Hartmann, 1999a,b), eine mögliche Erklärung

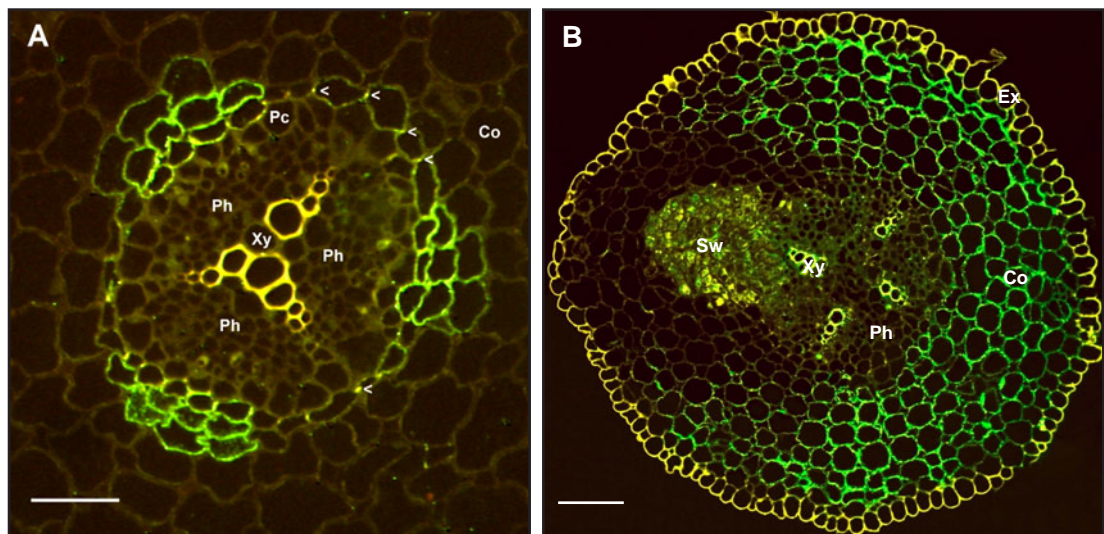
für das Vorkommen von Spuren an Homospermidin auch in nicht PA-führenden Pflanzen (Ober et al., 2003a). Umgekehrt konnte durch Protein-Protein-Bindungsstudien sowie durch kinetische Kompetitionsstudien eindeutig belegt werden, daß die HSS nicht in der Lage ist, das eIF5A-Substratprotein zu binden (Ober et al., 2003b).

Die hohe Identität sowohl auf Sequenzebene der cDNAs als auch der genomischen Strukturen, die Übereinstimmung hinsichtlich wichtiger kinetischer Parameter und nicht zuletzt der gleiche Reaktionsmechanismus von HSS und DHS legen den Schluß nahe, daß die HSS durch Genduplikation aus der DHS entstanden ist. Die dabei neu entstandene Genkopie hat danach vermutlich als Folge von Mutationen die DHS-Aktivität verloren, wodurch es dem strengen Selektionsdruck des hoch konservierten Primärstoffwechsels entzogen wurde. Die einstige Nebenreaktion (Aminobutylierung von Putrescin) wurde zur Hauptreaktion und das neu entstandene Enzym unterlag möglicherweise als Schlüssel zu einem effektiven Fraßschutz fortan dem Selektionsdruck der Herbivorie (Ober und Hartmann, 1999b, 2000).

Das auffallend sporadische Vorkommen der HSS innerhalb der Angiospermen wirft die Frage auf, ob die HSS nur einmal aus der DHS rekrutiert worden ist oder ob sie mehrfach unabhängig aus ihr hervorgegangen ist. Im Falle eines monophyletischen Ursprungs der HSS hätten die heute PA-freien Pflanzen im Verlauf der Evolution die Fähigkeit zur Synthese der PAs wieder verlieren müssen, z.B. als Folge einer Anpassung an einen Lebensraum, der eine aktive Verteidigung entbehrlich macht. Ebenso könnte ein alternatives und besseres Verteidigungssystem die PA-Biosynthese ersetzt haben. Im Falle eines polyphyletischen Ursprungs hingegen hätten sich parallele Biosynthesewege mit zum Teil identischen Produkten entwickeln müssen. Eine phylogenetische Analyse von 24 cDNA-Sequenzen der HSS und DHS verschiedener PA-produzierenden Pflanzen aus verschiedenen Familien inklusive 4 aus Datenbanken entnommener Sequenzen von *Arabidopsis*, *Dianthus caryophyllus*, Tomate und Banane ergab mindestens 4 unabhängige Ursprünge der HSS innerhalb der Angiospermen: einen Ursprung für die monokotylen Orchidaceae, einen innerhalb der Borginaceae und zwei innerhalb der Familie der Asteraceae (einen für die Gattungsgruppe Eupatorieae, einen für die Gattungsgruppe Senecioneae) (Reimann et al., 2004).

Aus diesem polyphyletischen Ursprung der HSS innerhalb der Angiospermen leiten sich neue Fragestellungen hinsichtlich der Regulation der neu entstandenen HSS ab. Da die HSS im Anschluß an die Genduplikation einen kompletten Funktionswechsel von der Beteiligung an der Aktivierung des eIF5A hin zur spezifischen Biosynthese des Necin-

basengrundgerüstes der PAs erfahren hat, ist eine an die neue Funktion im Stoffwechsel der Pflanze angepaßte Regulation wahrscheinlich. Erste Untersuchungen zur Expression der HSS und DHS aus *S. vernalis* bestätigen die Ausrichtung der Regulation des neu entstandenen HSS-Gens entsprechend seiner neuen Funktion. Während die DHS von *S. vernalis* in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden konnte, zeigte das Gen der HSS ausschließlich in den Wurzeln von *S. vernalis* Expression. Mit Hilfe spezifischer, affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper gegen die HSS aus *S. vernalis* konnte die HSS zum ersten Mal gewebespezifisch in Gruppen von Zellen der Endodermis und des angrenzenden Rindenparenchyms lokalisiert werden (Moll et al., 2002) (Abb. 1.3 A). Interessanterweise liegen die markierten Zellen in direkter Nachbarschaft zum Phloem, über das die PAs nach ihrer Biosynthese transportiert werden (Hartmann et al., 1989). Parallel in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Arbeiten zeigten eindrucksvoll, wie hochspezifisch die Expression der HSS für jede einzelne Pflanze reguliert wird: Im Gegensatz zur Lokalisation der HSS in *S. vernalis* konnte in den jungen weißen, jährlich neu austreibenden Wurzeln von *E. cannabinum* das gesamte Rindenparenchym als Sitz der PA-Biosynthese identifiziert werden (Anke et al., 2004) (Abb. 1.3 B). Die unabhängige Rekrutierung des HSS-Gens innerhalb der beiden Gattungsgruppen Eupatorieae und Senecioneae könnte eine Erklärung für die unterschiedliche Lokalisation der HSS auf Gewebeebene sein.



**Abbildung 1.3:** Vergleich der Immunomarkierung der HSS in den Wurzelquerschnitten von *S. vernalis* und *E. cannabinum*. Zur spezifischen Markierung wurde ein FITC-markierter Antikörper verwendet. In *S. vernalis* (A) trat die grüne FITC-Markierung in Gruppen von Endodermis- und angrenzenden Rindenparenchymzellen in direkter Nachbarschaft zum Phloem auf (Moll et al., 2002). In *E. cannabinum* (B) hingegen zeigte das gesamte Rindenparenchym die spezifische FITC-Markierung (Anke et al., 2004). Die Zellen der Endodermis wurden nicht markiert. **Co-** Cortex (Rindenparenchym), **Ex-** Exodermis, **Pc-** Perizykel, **Ph-** Phloem, **Sw-** Seitenwurzelsanlage, **Xy-** Xylem. Der eingezeichnete Balken entspricht in beiden Abbildungen einer Länge von 50 µm.

## 1.3 Problemstellung

Im Verlauf der Evolution ist die HSS innerhalb der Angiospermen mindestens viermal unabhängig aus der DHS durch Genduplikation entstanden. Die daraus neu hervorgegangene HSS hat einen Funktionswechsel von der Beteiligung an der Aktivierung des eIF5A hin zur spezifischen Biosynthese des Necinbasengrundgerüsts der PAs erfahren. Vor diesem Hintergrund sollte die gewebespezifische Expression der HSS im Vergleich zur DHS in den Boraginaceae untersucht werden. Innerhalb der Asteraceae (*S. vernalis* und *E. cannabinum*) konnte bereits gezeigt werden, daß erstens die HSS eine von der DHS unabhängige Regulation besitzt und zweitens, daß die HSS in beiden Arten ein unterschiedliches Expressionsmuster zeigt, was als weiterer Beleg für den polyphyletischen Ursprung der HSS in beiden Linien gewertet wurde.

Bei den Boraginaceen, innerhalb derer die HSS offensichtlich auch unabhängig aus der DHS rekrutiert wurde, ist die Ausgangssituation anders. Tracerversuche deuten bereits darauf hin, daß die PA-Biosynthese und damit auch die HSS in verschiedenen Arten jeweils unterschiedlich exprimiert zu sein scheint (s. Kap. 1.1.1). Dieses Phänomen sollte eingehend mit molekularbiologischen und immunologischen Methoden untersucht werden. In die Untersuchung wurde auch die Astereaceae *S. jacobaea* mit einbezogen, um eine mögliche Variabilität des HSS-Expressionsmusters vergleichend auch innerhalb der Senecioneae zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Kits, Enzyme und spezielle Materialien

Alle verwendeten Grundchemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Riedel de Haen, Roth und Sigma in der Qualität „reinst“ benutzt. Auf Abweichungen wird an gegebener Stelle hingewiesen.

Allgemeine Materialien für das molekularbiologische Arbeiten wie Polymerasen, dNTPs und Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Invitrogen, MBI Fermentas New England Biolabs und Promega bezogen.

Die Bezugsquellen zusätzlich benötigter spezieller Chemikalien, Kits, Enzyme, DNA- und Proteinleitern, Materialien für die Mikroskopie werden an entsprechender Stelle im Text erwähnt. Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte ihre Verwendung nach Herstellerprotokoll.

Alle hergestellten Lösungen wurden mit Reinstwasser (Milli Q System, Millipore) angesetzt und gegebenenfalls anschließend im Autoklaven sterilisiert (121°C, 1,1 bar) oder bei thermolabilen Verbindungen sterilfiltriert (Celluloseacetatfilter, 0,22 µm). Anzusetzende Verdünnungen wurden gleichfalls mit sterilem Reinstwasser angesetzt, wenn nicht im Text anders beschrieben.

### 2.2 Pflanzenmaterial

***Cynoglossum officinale* (Boraginaceae)** Pflanzenmaterial der zweijährigen Pflanze konnte im Arzneipflanzengarten gesammelt werden. Zusätzlich wurde von diesen Pflanzen gewonnenes Saatgut kurz vor Beginn der Vegetationsperiode im Gewächshaus auf Anzuchterde (Manna Flor Typ I) zum Keimen gebracht. Die Keimlinge wurden dann auf Blumenerde (Compo Sana) umgesetzt und nach der Frostperiode ins Freiland gestellt. Um die Topfpflanzen im Herbst vor Frostschäden zu schützen, wurden sie mit dem Beginn der Frostperiode in das Gewächshaus verbracht und standen nach dem Austreiben im folgenden Frühjahr als zweijährige Pflanzen zur Verfügung.

***Symphytum officinale* (Boraginaceae)** Frische Pflanzenproben der mehrjährigen Staude *Symphytum officinale* konnten im Arzneipflanzengarten gesammelt werden. Um einen besseren Zugang zu den Wurzeln zu ermöglichen, wurden Staudenteile vegetativ in Blumenerde (Compo Sana) vermehrt und im Topf kultiviert. Zusätzlich stand mir eine bereits vor Beginn meiner Arbeiten etablierte Sterilkultur auf MS-20-Medium zur Verfügung. Einjährige Pflanzen wurden wie für *C. officinale* beschrieben aus gekauftem Saatgut (Bornträger) gezogen.

***Heliotropium indicum* (Boraginaceae)** Die immergrüne Pflanze wurde im Gewächshaus bei 25°C gezogen und stand somit ganzjährig zur Verfügung. In unregelmäßigen Abständen wurden die Pflanzen vegetativ vermehrt. Um in den Wintermonaten einer Schädigung der Pflanze durch Lichtmangel vorzubeugen, wurden die Pflanzen über diesen Zeitraum mit Natriumdampflampen zusätzlich bestrahlt.

***Senecio jacobaea* (Asteraceae)** Frisches Pflanzenmaterial der mehrjährigen Staude wurde zu verschiedenen Zeitpunkten im Freiland gesammelt (Ruderalbereich Nähe Institut). Darüber hinaus wurden Ableger dieser Wildsammlung im Topf auf Blumenerde im Arzneipflanzengarten kultiviert.

Alle benötigten Sterilkulturen wurden im Kulturraum mit 16 h Licht und 8 h Dunkelheit bei 25°C auf MS-20 Medien geführt.

#### MS-20 Medium

|                                      |         |                              |         |
|--------------------------------------|---------|------------------------------|---------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>      | 0,330 g | Na-Fe-EDTA                   | 0,040 g |
| KNO <sub>3</sub>                     | 1,900 g | Myo-Inositol                 | 0,100 g |
| CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O | 0,440 g | PM <sub>6</sub> -Stammlösung | 1 ml    |
| MgSO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O | 0,370 g | Spurenelemente-Stammlösung   | 1 ml    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,170 g | KI-Stammlösung               | 1 ml    |
| Saccharose                           | 30,0 g  |                              |         |
| Wasser ad 1000 ml, pH 5,8            |         |                              |         |

| <b>Spurenelemente-Stammlsg.</b>       |              | <b>PM6-Stammlsg.</b> |              |
|---------------------------------------|--------------|----------------------|--------------|
| MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O   | 10,0 g       | Mesoinositol         | 100,0 g      |
| ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O  | 8,6 g        | Thiamin-HCl          | 10,0 g       |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>        | 6,2 g        | Nicotinsäure         | 1,0 g        |
| NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O | 0,250 g      | Pyridoxin-HCl        | 1,0 g        |
| CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O  | 0,025 g      | Wasser               | ad 1000.0 ml |
| CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O  | 0,025 g      |                      |              |
| Wasser                                | ad 1000,0 ml |                      |              |
| <b>KI-Stammlsg.</b>                   |              |                      |              |
| KI                                    | 750 mg       |                      |              |
| Wasser                                | ad 1000,0 ml |                      |              |

## 2.3 Molekularbiologische Techniken

### 2.3.1 Klonierung und Expression von 6xHis-Tag markierten Proteinen

Eine einfache und elegante Methode zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen ist die Metallaffinitätschromatographie mit Hilfe von positiv geladenen Metallionen, die kovalent an eine Säulenmatrix gebunden sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kits mit Nickel (Ni-NTA, Qiagen) und Cobalt (Talon<sup>®</sup>, Clontech) als zentrales Metallion nach der jeweiligen Herstellervorschrift verwendet. Damit die Proteine an die Matrix binden können, müssen sie über einen Histidin-Tag bestehend aus 6 Histidin-Resten entweder am N- oder C-terminalen Ende verfügen.

#### 2.3.1.1 Einführung des 6xHis-Tag-Motives durch PCR

Das Anfügen der codierenden Sequenz für die 6 Histidin-Reste an das 3' Ende der jeweiligen cDNA erfolgte durch PCR. Dazu wurde ein jeweils passender Reverse-Primer entworfen, der neben den zur jeweils entsprechenden cDNA komplementären Bereich die kodierende Sequenz für 6 Histidin-Reste, ein Stopp-Codon sowie eine *Bam*HI Restriktionsschnittstelle enthielt (s. Tab. 2.1). Die Restriktionsschnittstelle wurde für die Ligation in den Vektor pET-3a-mod benötigt (s. Kap. 2.3.3.1).

Für diese „full-length“ PCR wurde die *Pfx*-DNA-Polymerase (Invitrogen) verwendet, um die Lesegenauigkeit und die Ausbeute zu erhöhen. Die *Pfx*-DNA-Polymerase zeichnet sich durch ihre 3'-5' Exonukleaseaktivität („proofreading“-Aktivität) aus, wodurch



die Lesegenauigkeit gegenüber der „normalen“ *Taq*-DNA-Polymerase deutlich erhöht ist. Ein weiterer Vorteil dieser Polymerase lag darin begründet, daß sie erst bei 95 °C automatisch aktiviert wird (automatischer „hot-start“) und somit der gesamte PCR-Ansatz im Vorfeld zusammenpipettiert werden konnte. Ein Aufteilen in Vorlage und Mastermix war somit nicht notwendig.

Folgender Ansatz wurde auf Eis in der angegebenen Reihenfolge in ein PCR-Gefäß pipettiert:

|                                       |                |
|---------------------------------------|----------------|
| Wasser                                | 35,0 µl        |
| 10x <i>Pfx</i> Amplifikations-Puffer  | 5,0 µl         |
| Plasmid-DNA (Midipräp 1:100)          | 3,0 µl         |
| Expressionsprimer forward (10 µM)     | 2,0 µl         |
| Expressionsprimer reverse (10 µM)     | 2,0 µl         |
| 10 mM dNTPs                           | 1,5 µl         |
| 50 mM MgSO <sub>4</sub>               | 0,5 µl         |
| <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl) | 0,5 µl         |
| <b>Gesamtvolumen</b>                  | <b>50,0 µl</b> |

Anschließend wurde ein Thermocycler auf 95 °C vorgeheizt und die PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

| Programm            | Temperatur | Zeit       | Zyklen |
|---------------------|------------|------------|--------|
| Primärdenaturierung | 95 °C      | 2 min 30 s | -      |
| Denaturierung       | 95 °C      | 45 s       | 35     |
| Annealing           | 63 °C      | 1 min      |        |
| Elongation          | 72 °C      | 2 min      |        |
| Elongation          | 72 °C      | 10 min     | -      |
|                     | 15 °C      | ∞          | -      |

### 2.3.2 Agarose Gelelektrophorese von Nucleinsäuren

Zur Identifizierung und zur Kontrolle von Qualität und Quantität der erhaltenen DNA-Fragmente wurden sie ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Da die zu er-

| cDNA                 | Primer         | Nukeinsäuresequenz  |
|----------------------|----------------|---|
| HSS                  | Exp-CoW-For    | 5'-ATATACATATGGAGAAGTAGCAACCCAGCAACAA-3'                      |
| <i>C. officinale</i> | Exp-CoW-Rev    | 5'-ATTGGATCCTCAATGATGATGATGATGATGCTTAGATAAATTATTGGCCTGTT-3'   |
| DHS                  | Exp-CoS-For    | 5'-TACTCGAGATGGGGGAAGCCCTTGAAAAGAGCAA-3'                      |
| <i>C. officinale</i> | Exp-CoS-revHis | 5'-ATTGGATCCTCAATGATGATGATGATGATGCAACTTGTTATCTGCAGATTTACT-3'  |
| HSS                  | Exp-SoW-For    | 5'-TACTCGAGATGGGGGAAGTAGCCCGCTGCT-3'                          |
| <i>S. officinale</i> | Exp-SoW-2Rev   | 5'-TATGATCATCATGATGATGATGATGCTTAGATAAATTATTGGCCTGTT-3'        |
| DHS                  | Exp-SoS-For    | 5'-TACTCGAGATGGGTGAAGCCATGAAAAGAGCAG-3'                       |
| <i>S. officinale</i> | Exp-SoS-revHis | 5'-ATTGGATCCTCAATGATGATGATGATGATGCAACTTGTTCCTGCAGATTTAGT-3'   |
| HSS                  | Exp-HiS-For    | 5'-ATATACATATGGGAGAGGTAGCCACAAATGCT-3'                        |
| <i>H. indicum</i>    | Exp-HiS-2rev   | 5'-ATTGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGACTTGATTTCCTACCCCTTGGCAAA-3' |
| DHS                  | Exp-HiW-For    | 5'-TACAGATGGGAGATGTGAGTGAAGAGCAG-3'                           |
| <i>H. indicum</i>    | Exp-HiW-revHis | 5'-ATTGGATCCCTAATGATGATGATGATGATGGCCAGATTTAATTACTTTGTGG-3'    |

Tabelle 2.1: Primertabelle zur Neuklonierung der 6xHis-Tag Proteine

wartenden Fragmente hinsichtlich ihrer Größe bekannt waren, konnten standardmäßig 1 %ige Agarose-Gele genutzt werden. Dazu wurde die erforderliche Menge an Agarose (NEO Ultra-Qualität, Roth) eingewogen und in 1x TBE-Puffer bis zur klaren Lösung geschmolzen. Die Lösung wurde auf 60 °C abgekühlt, mit 0,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml Stammlösung) pro ml Gel versetzt und in einen Gelschlitten gegossen, um es anschließend bei Raumtemperatur erstarren zu lassen. Auf Grund der hohen Toxizität des zugesetzten Ethidiumbromids wurde unter dem Abzug gearbeitet.

Die DNA-Proben wurden dann mit DNA-Probenpuffer im Verhältnis 1:2 versetzt, vorsichtig durchmischt und in die Geltaschen aufgetragen. Der blaue Probenpuffer diente zur Erhöhung der Probendichte und als visueller Kontrollmarker. Zusätzlich wurde bei jeder Auftrennung eine 100 bp und/oder eine 1 kb DNA-Leiter (beide Invitrogen) zur Bestimmung der Größe der Fragmente aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE-Puffer bei 2,8 V/cm Elektrodenabstand bis die Bromphenolblau-Front etwa 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Zum Einsatz kam eine Elektrophoresekammer der Firma Biorad (Mini Sub Cell GT) in Verbindung mit dem Spannungsgeber Consort E815 der Firma LTF. Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden anschließend durch UV-Licht (Multiimage Lightcabinet, Biozym) detektiert. Das zugesetzte Ethidiumbromid interkaliert mit den Nukleinsäuren, wodurch diese fluoreszieren. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte dann rechnergestützt mit dem Alphaimage 1220 (Software-Version 5.5).

| <b>10x TBE-Puffer</b> |              | <b>DNA-Probenpuffer</b> |             |
|-----------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| Tris-Base             | 108,0 g      | Xylencyanol             | 0,25 g      |
| Borsäure              | 55,0 g       | Bromphenolblau          | 0,25 g      |
| EDTA                  | 7,3 g        | Ficoll 400              | 25,0 g      |
| Wasser                | ad 1000,0 ml | EDTA                    | 1,46 g      |
|                       |              | Wasser                  | ad 100,0 ml |

### 2.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Gehaltsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte UV-photometrisch (Ultraspec 3100pro, Amersham Bioscience). Dazu wurde eine 1:100 Verdünnung der jeweiligen Probe in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke 1 cm bei den Wellenlängen 260, 280 und 320 nm vermessen. Bei 260 nm entspricht eine Absorption von 1 einer RNA-Konzentration von

40 µg/ml bzw. einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Verunreinigungen mit Proteinen wurden dabei bei 280 nm erfaßt, mit Polysacchariden bei 320 nm, so daß zusätzlich Aussagen über die Reinheit der Probe getroffen werden konnten. Über den Quotienten aus den Absorptionswerten bei 260 nm/280 nm konnte so auf die Qualität der Probe geschlossen werden. Der Wert sollte zwischen 1,5 und 2 liegen.

Der Gehalt konnte dann nach folgender Formel berechnet werden:

Konzentration der RNA (µg/ml) =  $A_{260\text{ nm}} \times 40 \times 100$  (Verdünnungsfaktor)

Konzentration der DNA (µg/ml) =  $A_{260\text{ nm}} \times 50 \times 100$  (Verdünnungsfaktor)

### 2.3.3.1 Klonierung

Das PCR-Produkt (s. Kap. 2.3.1.1) wurde dann in den Vektor pET-3a bzw. in den modifizierten Vektor pET-3a-mod kloniert. Zu diesem Zweck wurden in der vorgeschalteten PCR (s. oben) mit Hilfe der genspezifischen Primer für den jeweiligen Vektor passende Restriktionsschnittstellen eingefügt, wobei erstere vor das Start-ATG und letztere hinter das Stopp-Codon des offenen Leserahmens platziert wurde. Da die Restriktionsschnittstellen Teil der jeweiligen „multiple-cloning-site“ des entsprechenden Vektors waren, konnte die amplifizierte und über eine Silikagelmembran (Nucleospin Extract, Macherey&Nagel) gereinigte DNA mit den dazu passenden Restriktionsenzymen geschnitten und in den linearisierten Vektor ligiert werden.

Ein Doppelverdau war im Fall der Kombination *Xho*I und *Bam*HI im Gegensatz zur Kombination *Nde*I und *Bam*HI nicht möglich, da die Enzyme unterschiedliche Puffer für ihre optimale Aktivität benötigten. Da der Reaktionspuffer für das Enzym *Xho*I eine geringere Salzkonzentration aufwies als der Puffer für *Bam*HI wurde zunächst mit *Xho*I geschnitten.

Ein typischer **Restriktionsansatz** bestand aus folgenden Komponenten:

| Komponente                    | Volumen        |
|-------------------------------|----------------|
| Wasser                        | X µl           |
| 10x Reaktionspuffer           | 2,0 µl         |
| 1 µg Plasmid-cDNA bzw. Vektor | Y µl           |
| 10 U/µl Restriktionsenzym     | 2,0 µl         |
| <b>Gesamtvolumen</b>          | <b>20,0 µl</b> |

Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert. Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte im Anschluß daran durch 10 minütiges Erhitzen auf 65 °C. Eine weitere Aufreinigung von geschnittener cDNA und linearisiertem Vektor erfolgte über eine Silikamembran, um Enzym- und Pufferreste vor der Ligation zu entfernen. Die Qualität von cDNA und Vektor wurde dann mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.3.2) visuell überprüft. Ein Teil des Ansatzes wurde für die folgende Ligation eingesetzt, der Rest wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Ligation erfolgte in einem molaren Verhältnis von 30 fmol geschnittenen Vektor zu 300 fmol geschnittener cDNA (1:10), um einen möglichst optimalen Verlauf der Ligation zu gewährleisten. Die Molarität für 1 fmol pro ng DNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$1 \text{ fmol} = \text{Anzahl der Basenpaare der Insert-DNA oder entsprechender Vektor} \times 308 \text{ (durchschnittliche molare Masse einer Base)} \times 10^{-6} \text{ ng}$$

Dabei wurde ein maximaler Gehalt von 100 ng cDNA pro Ansatz nicht überschritten. Für die Ligation wurden folgende Komponenten in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert:

| Komponente                        | Volumen        |
|-----------------------------------|----------------|
| Wasser                            | X µl           |
| 5x DNA-Ligase-Puffer (Invitrogen) | 2,0 µl         |
| 30 fmol Vektor                    | Y µl           |
| 300 fmol cDNA                     | Z µl           |
| 1 U/µl T4 DNA-Ligase (Invitrogen) | 1,0 µl         |
| <b>Gesamtvolumen</b>              | <b>10,0 µl</b> |

Der Ansatz wurde für 1 h bei 25 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend konnte dieser Ansatz direkt für die Transformation in den *E. coli* Stamm DH5α verwendet werden. Nicht sofort benötigte Aliquots wurden bei -20 °C eingefroren.

**pET-3a Vektor (Novagen)/pET-3a-mod Vektor** Der pET-3a-Vektor wurde speziell für die Klonierung und Expression von rekombinanten eukaryontischen Proteinen in *E. coli* entwickelt (Studier und Moffatt, 1986; Rosenberg et al., 1987; Studier et al., 1990). Zu diesem Zweck verfügt er über eine sehr effiziente Ribosomen-Bindungsstelle.

Als Selektionsmarker besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz. Das Zielgen steht bei diesem Vektor unter der Kontrolle des T7-Promotors. Eine Expression erfolgt nach Induktion der T7 RNA Polymerase, die durch das Genom der passenden Wirtszelle codiert ist.

Der modifizierte pET-3a-mod Vektor ist das Produkt einer zielgerichteten Mutagenese aus dem pET-3a Vektor. Dabei wurde in der „cloning-site“ die *NdeI*-Schnittstelle gegen eine *XhoI*-Schnittstelle ausgetauscht, da das Enzym *NdeI* im Bereich der zu klonierenden cDNA schnitt.

### 2.3.4 Transformation

Bevor DNA im Zuge einer Transformation in eine Bakterienzelle übertragen werden kann, muß die jeweilige Zelle zuvor zur Aufnahme befähigt worden sein. Diese Kompetenz kann auf unterschiedliche Weise erzeugt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die benötigten *E. coli* Stämme DH5 $\alpha$  und BL21 (DE3) nach einer modifizierten Vorschrift von Cohen (1972) mit CaCl<sub>2</sub> kompetent gemacht.

#### 2.3.4.1 Herstellen kompetenter Zellen

Die Bakterienkulturen wurden bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,6 angezogen (siehe Kap. 2.3.6) und für 10 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen bei 3000 Upm für 10 min in der Zentrifuge abgetrennt. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem 0,1M CaCl<sub>2</sub> vorsichtig resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 3000 Upm für 5 min wurde das Pellet in 5 ml einer eiskalten Lösung von 0,1M CaCl<sub>2</sub>, welche zuvor mit 15 % (m/v) Glycerin versetzt worden ist, resuspendiert und für 12-24 h auf Eis inkubiert, bis die optimale Transformationseffizienz erreicht wurde.

Die Zellen wurden dann zu 100 und 200  $\mu$ l aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert, wo sie für mindestens 6 Monate stabil waren.

#### 2.3.4.2 Transformation kompetenter Zellen

Das neu konstruierte Plasmid wurde nicht direkt in den *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert, sondern zunächst im *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  vermehrt. Dieser Stamm verfügt nicht über die zur Induktion der Expression notwendige T7 RNA Polymerase,

zeichnet sich dafür aber durch eine im Vergleich zum *E. coli* Stamm BL21 wesentlich effizientere Transformationsrate aus.

Zur Transformation in kompetente Zellen (s. Kap. 2.3.4.1) vom *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  wurden 100  $\mu$ l Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Zu diesen Zellen wurden vorsichtig 7,5  $\mu$ l Ligationsansatz pipettiert, und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 1 minütigem Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C wurde der Ansatz sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 400  $\mu$ l auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und der gesamte Ansatz für 60 min bei 37 °C geschüttelt (250 Upm). Anschließend wurden 200  $\mu$ l auf einer LB-Agarplatte mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin ausgespatelt und für 15 h bei 37 °C inkubiert.

Um zu überprüfen, ob der bei der Transformation aufgenommene Vektor auch die zu klonierende cDNA enthielt, wurde die in den auf der Platte gewachsenen Klonen enthaltene Plasmid-DNA als Template für eine PCR mit den jeweils spezifischen Expressionsprimern eingesetzt. Dazu wurde jeweils ein Klon mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in einer Mikrotiterplatte in 20  $\mu$ l sterilem Wasser resuspendiert. Von diesem Ansatz wurden 10  $\mu$ l in ein PCR-Gefäß überführt, der Rest wurde bis zur Auswertung mit 100  $\mu$ l LB-Medium versetzt und bei 4 °C aufbewahrt. Die Zellen wurden danach im Thermocycler mit dem folgenden Programm aufgeschlossen:

| Temperatur | Zeit     | Zyklen |
|------------|----------|--------|
| 96 °C      | 15 s     | -      |
| 96 °C      | 5 min    | 2      |
| 50 °C      | 90 s     |        |
| 96 °C      | 90 s     |        |
| 45 °C      | 1 min    |        |
| 96 °C      | 1 min    |        |
| 40 °C      | 1 min    |        |
| 4 °C       | $\infty$ | -      |

Im Anschluß wurde eine PCR mit dem Programm der „full length“ PCR aus Kapitel 2.3.1.1 durchgeführt. Der „hot start“ wurde hier jedoch manuell ausgeführt, da für das routinemäßige Screenen nur die „normale“ *Taq*-DNA-Polymerase verwendet wurde. Nach einer Anfangsdenaturierung von 2 min 30 s bei 95 °C wurde jedem PCR-Ansatz der folgende Mastermix zugesetzt:

| Komponente                                  | Volumen                       |
|---|-------------------------------|
| Wasser                                      | 9,125 $\mu$ l                 |
| 10x PCR-Puffer                              | 2,5 $\mu$ l                   |
| jew. forward Expressionsprimer (10 $\mu$ M) | 1,0 $\mu$ l                   |
| jew. reverse Expressionsprimer (10 $\mu$ M) | 1,0 $\mu$ l                   |
| 50 mM MgCl <sub>2</sub>                     | 0,75 $\mu$ l                  |
| 10 mM dNTPs                                 | 0,50 $\mu$ l                  |
| 5 U/ $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase             | 0,125 $\mu$ l                 |
| <b>Gesamtvolumen</b>                        | <b>15,0 <math>\mu</math>l</b> |

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz aus 10  $\mu$ l sterilem Wasser ohne Bakteriensuspension. Für die Positivkontrolle wurde die zu klonierende Plasmid cDNA in einer 1:100 Verdünnung als Vorlage verwendet.

Die Auswertung und Dokumentation erfolgte dann im Anschluß an die Agarose Gelelektrophorese (s. Kap. 2.3.2) mit dem Alphaimager 1220. Von den positiven Klonen wurden die 100  $\mu$ l Bakteriensuspension in 7 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 16 h bei 37 °C inkubiert. Von den gewachsenen Bakterienkulturen wurde die Plasmid-DNA isoliert (s. Kap. 2.3.5).

Die Transformation in kompetente Zellen des exprimierenden *E. coli* Stammes BL21 (DE3) erfolgte in analoger Weise, nur daß hier anstelle des Ligationsansatzes 0,5-1  $\mu$ l isolierte Plasmid-DNA eingesetzt wurde.

### 2.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach der folgenden Labormethode. Die Bakterien wurden zunächst mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und die genomische DNA durch Präzipitation abgetrennt. Die anschließende Isopropanol-Fällung lieferte Plasmid-DNA mit ausreichender Qualität für sich anschließende Transformationen.

Die Plasmid-tragenden Bakterienkulturen vom *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  wurden wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben über Nacht angezogen. Von der Kultur wurden 2,5 ml in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und die Zellen bei 6000 Upm für 3 min abzentrifugiert (MiniSpin plus, Fa Eppendorf oder 1 K15, Fa Sigma). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde dann in 200  $\mu$ l Lösung 1 resuspendiert und kurz auf Eis gestellt. Anschließend wurden 400  $\mu$ l frisch hergestellter Lösung 2 zugegeben und vorsichtig gemischt. Die



Zelllyse erfolgte für genau 5 min auf Eis. Die Zeitdauer von 5 min sollte dabei nicht überschritten werden, um eine irreversible Denaturierung der Plasmid-DNA zu vermeiden. Durch Zugabe von 300 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>-Acetat Lösung wurde die bakterielle genomische DNA über den Zeitraum von 10 min auf Eis gefällt und anschließend durch 15 minütige Zentrifugation bei 15.000 Upm abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit 0,6 VT Isopropanol auf 1 VT Überstand versetzt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte dann für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde für 10 min bei 15000 Upm zentrifugiert, um die Plasmid-DNA abzutrennen. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 70 % (v/v) igem unvergälltem Ethanol gewaschen und nochmals unter Verwerfen des Überstandes für 3 min bei 15000 Upm zentrifugiert. Das Trocknen der Plasmid-DNA erfolgte bei Raumtemperatur oder vorsichtig im Heizblock bei 37 °C. Abschließend wurde das Pellet in 50 µl 10 mM Tris-HCl-Lösung pH 8 resuspendiert, die 0,5 µg/ml DNase-freie RNase (DNase-free Rnase, Roche) enthielt. Die Lösung wurde anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert, um die enthaltene RNA zu verdauen.

Die so gewonnene Plasmid-DNA konnte direkt zur Transformation in den proteinexprimierenden *E. coli* Stamm BL21 (DE3) eingesetzt werden (s. Kap. 2.3.4). Nicht sofort benötigte Plasmid-DNA wurde bis zur Benutzung bei -20 °C gelagert.

| <b>Lösung I</b>                   |                    | <b>Lösung II</b>               |      |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------------------|------|
| Glukose                           | 0,99 g             | 2N NaOH                        | 1 ml |
| Tris-Base                         | 0,30 g             | 10% (m/v) SDS                  | 1 ml |
| EDTA                              | 0,37 g             | Vor Gebrauch frisch angesetzt. |      |
| Wasser                            | ad 100,0 ml, pH8   |                                |      |
| <b>10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8</b> |                    |                                |      |
| Tris                              | 12,11 g            |                                |      |
| Wasser                            | ad 100,0 ml        |                                |      |
| pH 8 (eingestellt mit 1 mM HCl)   |                    |                                |      |
| <b>SOB-Medium</b>                 |                    |                                |      |
| Trypton                           | 4,0 g              |                                |      |
| Hefeextrakt                       | 1,0 g              |                                |      |
| NaCl                              | 116,90 mg          |                                |      |
| KCl                               | 37,28 mg           |                                |      |
| Wasser                            | ad 200,0 ml, pH7,5 |                                |      |

Der autoklavierten Lösung wurden anschließend 1 ml 1 M  $\text{MgCl}_2$ -Lsg. und 1 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$ -Lsg. (beide sterilfiltriert) zugesetzt.

### **SOC-Medium**

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| SOB-Medium              | 100,0 ml |
| 50 % (m/v) Glukose-Lsg. | 0,8 ml   |

### **2.3.6 Heterologe Expression in *E. coli***

Im Anschluß an die Transformation in den proteinexprimierenden *E. coli* Stamm BL21 (DE3) wurde ein einzelner Klon mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 50 ml LB-Medium mit 500  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin überführt und für 6 h bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 angezogen. Von dieser Kultur wurden 750  $\mu\text{l}$  abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 250  $\mu\text{l}$  LB-Glycerin versetzt. Diese Dauerkultur wurde dann bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert und konnte für weitere Proteinexpressionen genutzt werden. Der Rest der Kultur wurde zur Induktion der Expression mit IPTG versetzt (1,25 mM Endkonzentration) und für weitere 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei  $4^\circ\text{C}$  und 6000 Upm (DuPont Sorvall RC-5B, GSA-Rotor) abzentrifugiert und bis zur Analyse bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Um größere Mengen an Protein z.B. für die Proteinaufreinigung (s. Kap. 2.4.4) und die Antikörpergewinnung (s. Kap. 2.5.2) zu exprimieren, wurden Zellen eines entsprechenden Klons mit Hilfe einer Impföse aus einer Dauerkultur auf eine LB-Agarplatte mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin ausgestrichen und für 15 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Von dieser Agarplatte wurde mit einem Zahnstocher ein Klon gepickt, in 50 ml LB-Medium mit 500  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin überführt und für 15 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 100 ml LB-Medium mit 500  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin überführt und für 6 h bei  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 angezogen. Die anschließende Expression nach Induktion mit IPTG (1,25 mM Endkonzentration) erfolgte über einen Zeitraum von 6 h bei  $37^\circ\text{C}$ . Die Zellen wurden durch 30 minütiges Zentrifugieren bei  $4^\circ\text{C}$  mit 6000 Upm geerntet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

**LB-Medium**

---

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| Trypton     | 10,0 g              |
| Hefeextrakt | 5,0 g               |
| NaCl        | 10,0 g              |
| Wasser      | ad 1000,0 ml, pH7,5 |

Zur Herstellung von **LB-Agarplatten** wurden dem Medium 16 g Agar pro 1 l Flüssigmedium zugesetzt. Das für die Dauerkulturen benötigte **LB-Glycerin** wurde analog dem Flüssigmedium in einem Gemisch aus 6 T Glycerin und 4 T Wasser angesetzt.

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 Quantifizierung, Umpufferung, Aufkonzentrierung und Fällung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteingehalte erfolgte nach der von Bradford (1972) beschriebenen Methode. Dabei kommt es zu einer Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an die zu vermessenden Proteine, was eine Farbverschiebung von 465 nm zu 595 nm (rot -> blau) verursacht. Die daraus resultierende Absorptionsänderung ist proportional zur Proteinkonzentration.

Zur Bestimmung wurden 20 µl Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und die Absorption bei 595 nm in Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm photometrisch (Ultrospec 3100 pro, Amersham Pharmacia) vermessen. Vor jeder Bestimmung wurde eine Kalibriergerade mit 0,1-1,0 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzprotein erstellt. Ein Mikroansatz wurde zum Überprüfen der Elutionsfraktionen auf ihren Proteingehalt bei der Proteinaufreinigung (s. Kap.2.4.4) genutzt. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte 100 µl Bradford-Reagenz mit 2 µl Probe gemischt und die Blaufärbung visuell beurteilt.

**Bradford Reagenz** Zur Herstellung wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml 95 % (v/v) Ethanol vollständig gelöst. Die Lösung wurde nach Zugabe von 100 ml 85 % (m/v) Phosphorsäure mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C unter Lichtausschluß.

Proteine, die besonders wichtig waren und nur in sehr kleinen Volumina zur Verfügung

standen (z.B. Antikörper), wurden durch Bestimmung der Absorption bei 280 nm quantifiziert. Dabei werden die aromatischen Aminosäuren der Proteine erfaßt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der nicht destruktiven Messung. Dabei entspricht eine Absorption bei 280 nm von 1 einer Proteinkonzentration von annähernd 1 mg/ml (Harlow und Lane, 1988). Für Antikörper und BSA gilt entsprechend:

| Protein | $OD_{280}$ (1 mg/ml) |
|---------|----------------------|
| IgG     | 1,35                 |
| IgM     | 1,20                 |
| BSA     | 0,7                  |

Im Verlauf von Protein- und Antikörperaufreinigungen war es häufig notwendig, Proteine umzupuffern und aufzukonzentrieren. Zum **Umpuffern** bzw. Entsalzen von Proteinproben wurden soweit nicht anders erwähnt PD-10 Säulen (Amersham Biosciences) verwendet. Diese wurden zunächst mit 20 ml des gewünschten Puffers äquilibriert. Anschließend wurden 2,5 ml Probe aufgegeben und mit 3,5 ml Puffer eluiert. Bei kleineren Probenvolumina wurde nach dem Einziehen der Probe in die Gelmatrix mit Puffer auf 2,5 ml ergänzt und mit entsprechend geringerer Menge eluiert. Nach Gebrauch wurden die Säulen nacheinander mit 20 ml Puffer und 10 ml einer 0,02 %igen (m/v) Natriumazid-Lösung gespült und bis zur Wiederverwendung bei 4 °C gelagert. Eine vollständige Regeneration der Säule z.B. bei einem Wechsel des Zielpuffers erfolgte durch ein Spülen mit 20 ml 0,2 N NaOH und einem anschließenden Äquilibrieren mit 20 ml 0,5 N NaCl-Lösung. Die Lagerung erfolgte danach wie oben beschrieben bei 4 °C unter Natriumazid.

Das **Aufkonzentrieren** von Proteinproben z.B. für die Antikörpergewinnung erfolgte mit Hilfe von Konzentratoren, die über eine Ausschlußgrenze der Membran von 30 kDa verfügen (Vivaspin 6, Vivascience). Dazu wurde die Lösung auf die Säule gegeben und bei 4 °C mit max. 6000 x g bis zur gewünschten Konzentration zentrifugiert. Die Konzentratoren wurden nach Gebrauch mit 70 % (v/v) Ethanol gespült und in einer 0,02 %igen Natriumazid-Lösung bei 4 °C bis zur Wiederverwendung gelagert.

Zur Analyse der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese oder im Western Blot war es notwendig, definierte Mengen an Protein aus verdünnten Lösungen auszufällen. Dazu wurden entsprechende Aliquots der Proben mit 1/10 VT 0,1 % (m/v) Na-Desoxycholat-Lösung und danach mit 1/10 VT 55 % (m/v) Trichloressigsäure versetzt und gut durchmischt. Das **Ausfällen** der Proteine erfolgte dann über den Zeitraum von 15 h bei 4 °C.

Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 4 °C mit 15000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde dann in 10 µl 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8 resuspendiert und stand für die SDS-Elektrophorese (s. Kap. 2.4.2) zur Verfügung.

### 2.4.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine wichtige Methode zur Analyse von Proteinen. Sie ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen bzw. Proteinuntereinheiten nach ihrer molekularen Größe. In Verbindung mit einem entsprechenden Größenmarker sind so Aussagen über die Reinheit und die Quantität der untersuchten Proteinlösung möglich, was z.B. bei der Kontrolle von Proteinaufreinigungen unerlässlich ist. Auch für den Western Blot (s. Kap. 2.5.3) mußte im Vorfeld eine Auftrennung über die SDS-Gelelektrophorese erfolgen.

Für die Analytik von HSS und DHS haben sich 12 %ige Trenngele als optimal erwiesen. Zum Einsatz kam die Elektrophorese-Apparatur Mini Protean III (Bio Rad) in Verbindung mit dem Multidrive XL (Pharmacia) als Spannungsgeber. Nach dem Gießen von Trenn- und Sammelgel wurden die Proben im Verhältnis 1:2 mit Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Die Proben wurden dann mit Hilfe einer Hamilton-Spritze aufgetragen, und die Elektrophorese in 1x SDS-Puffer bei 200 V, 75 mA und einer maximalen Leistung von 15 W durchgeführt. Zusätzlich zu den Proben wurden 3 µl der Standardproteinleiter (14,4-120 kDa, Fermentas) aufgetragen. Die Gele wurden im Anschluß daran entweder mit Coomassie-Blau-Färbung (s. Kap. 2.4.3.1) angefärbt oder unmittelbar für einen Western Blot (s. Kap. 2.5.3) eingesetzt.

| Komponente               | Trenngel [ml] | Sammelgel [ml] |
|--------------------------|---------------|----------------|
| Wasser                   | 3,3           | 3,4            |
| Acrylamid-Lösung         | 4,0           | 0,83           |
| 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8 | 2,5           | -              |
| 1,0 M Tris-Puffer pH 6,8 | -             | 0,63           |
| 10 % (m/v) SDS-Lösung    | 0,1           | 0,05           |
| 10 % (m/v) APS-Lösung    | 0,1           | 0,05           |
| TEMED                    | 0,004         | 0,005          |
| <b>Gesamtvolumen</b>     | 10,0          | 5,0            |

**Acrylamid-Lösung** Zum Einsatz kam ausschließlich Rotiphorese Gel 30 (Roth). Die fertige Lösung besteht aus 30 % (m/v) Acrylamid und 0,8 % (m/v) Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1.

| Laemmli-Puffer             |            | 10x SDS-Elektrodenpuffer      |            |
|----------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| 10 % (m/v) SDS-Lösung      | 3,3 ml     | Glycin                        | 144,0 g    |
| Glycerin (wasserfrei)      | 2,0 ml     | Tris-Base                     | 30,0 g     |
| 0,5 M Tris-Puffer pH 6,8   | 1,0 ml     | SDS                           | 10,0 g     |
| $\beta$ -Mercaptoethanol   | 0,5 ml     | Wasser                        | ad 1000 ml |
| 0,5 % (m/v) Bromphenolblau | 0,5 ml     | pH ca. 8,3, nicht einstellen! |            |
| Wasser                     | ad 10,0 ml | Vor Gebrauch 1:10 verdünnt!   |            |

### 2.4.3 Proteinfärbungen

#### 2.4.3.1 Coomassie Färbung

Die SDS-Elektrophoresegele wurden direkt unter leichtem Schütteln für 1 h mit Coomassie-Blau-Färbelösung angefärbt. Anschließend wurden sie nacheinander für 30 min in Entfärber I und für 2-3 h oder über Nacht in Entfärber II entfärbt. Nach dem Anfärben konnten die blau gefärbten Proteinbanden ausgewertet und unter Vis-Durchlicht analog Kap. 2.3.2 dokumentiert werden. In Folie eingeschweißt konnten die Gele über einen längeren Zeitraum bei 4 °C gelagert werden.

| Färbelösung              |             |
|--------------------------|-------------|
| 1 % (m/v) Coomassie Blau | 25,0 ml     |
| Methanol                 | 100,0 ml    |
| Eisessig                 | 20,0 ml     |
| Wasser                   | ad 200,0 ml |

| Entfärber I |             | Entfärber II |
|-------------|-------------|--------------|
| Methanol    | 100,0 ml    | 10,0 ml      |
| Eisessig    | 20,0 ml     | 14,0 ml      |
| Wasser      | ad 200,0 ml | ad 200,0 ml  |

### 2.4.3.2 Indian-Ink Färbung

Die von Hancock und Tsang (1983) beschriebene und von Ober (1997) leicht modifizierte Färbung von Protein-Blotmembranen beruht auf der Anlagerung von kolloidalen Kohlepartikeln aus der eingesetzten Tinte an das Protein. Diese Methode zeichnet sich durch eine im Vergleich zu anderen Färbungen sehr hohe Sensivität bei vergleichsweise geringen Kosten aus. So sind z.B. Proteinbanden noch bis zu einer Menge von 30 ng als Bande nachweisbar. Im Vergleich dazu liegt die Nachweisgrenze bei der Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Blau bei ca. 300 µg pro Bande.

Die Färbung aller Protein-Blotmembranen erfolgte mit Indian-Ink. Zu diesem Zweck wurden die Blotmembranen für 5 min in 0,2 N NaOH denaturiert und anschließend kurz mit 1x TBS-T gespült. Nach 2 weiteren Waschschritten für jeweils 10 min mit 1x TBS-T wurde die Membran für 1 h auf dem Schüttler mit Indian-Ink-Färbelösung inkubiert. Überschüssige Färbelösung wurde mit Wasser abgespült und die Membran abschließend an der Luft getrocknet. Nach der Auswertung konnte die Membran rechnergestützt wie in Kap. 2.3.2 beschrieben, jedoch unter Vis-Auflicht dokumentiert werden. Getrocknete Blotmembranen konnten über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

#### Indian-Ink-Färbelösung

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| 1x TBS-T                    | 100,0 ml |
| Eisessig                    | 1,0 ml   |
| Fount India Tinte (Pelikan) | 0,1 ml   |
| Vor Gebrauch filtrieren!    |          |

### 2.4.4 Reinigung der rekombinanten HSS und DHS über Metallchelatchromatographie

Die Reinigung von Proteinen über die Immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie (IMAC) ist eine sehr schnelle und äußerst effiziente Methode, da die gesamte Aufreinigung in nur einem Schritt erfolgt. Erstmals beschrieben wurde die Methode 1975 von Porath et al. (Porath et al., 1975). Die darauf einsetzende Entwicklung brachte vor allem Verbesserungen hinsichtlich des verwendeten Liganden, so z.B. die Verwendung von Nitrilo-Tri-Essigsäure (NTA) als Ligand (Hochuli et al., 1987). Dieser Ligand bindet

das zentrale  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion über 4 der 6 koordinierten Bindungsstellen des Metallions. Die 2 verbleibenden Bindungsstellen stehen für die spezifische Interaktion mit dem Histidin-Tag des Zielproteins zur Verfügung (Ni-NTA, Fa Qiagen). Die Fixierung des Liganden erfolgt über eine Kopplung an Sepharose als Gelmatrix.

Ein anderer Ansatz zur Optimierung bestand in der Wahl des zentralen Metallions. So wird im Fall der Talon<sup>®</sup>-Gelmatrix (Clontech, BD Biosciences)  $\text{Co}^{2+}$  eingesetzt. Ein zusätzlicher Vorteil dieses Systems resultiert daraus, daß das zentrale Metallion von einem vierzähligen Liganden fest in einer Art Tasche fixiert ist, wodurch ein Ausbluten des Ions beim Eluieren verhindert wird. Für die Bindung des zu reinigenden Proteins stehen ebenfalls 2 Positionen zur Verfügung, die Fixierung erfolgt hier wie bei der Ni-NTA an Sepharose.

In beiden Fällen kann das gebundene Protein entweder durch ein Absenken des pH-Wertes oder durch eine kompetitive Verdrängung mit Imidazol von der Säule eluiert werden. Im Falle der heterolog in *E. coli* exprimierten DHS und HSS (s.Kap. 2.3.1) wurde grundsätzlich letzteres Verfahren angewendet, da es schonender ist.

#### 2.4.4.1 Gewinnung des rekombinanten Proteins

Das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorene Zellpellet der heterolog in *E. coli* exprimierten HSS und DHS wurde aufgetaut und in 7 ml Lysispuffer pro 100 ml ursprüngliches Kulturvolumen resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch 10 minütiges Sonifizieren auf Eiswasser (Branson Sonifier Cell Disruptor B15, Standard-Mikrotip-Spitze, Pulsiereinrichtung auf 50 %). Die dabei entstandenen unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 15000 Upm abgetrennt und verworfen. Der klare Überstand konnte direkt für die Metallchelatchromatographie (s.Kap. 2.4.4.2) eingesetzt werden.

#### 2.4.4.2 Ni-Affinitätschromatographie

Die weitere Aufreinigung der HisTag-Proteine erfolgte nach einer leicht modifizierten Herstellervorschrift (The Qiaexpressionist, Qiagen) unter nativen Bedingungen.

Als Gefäß diente eine alte, zuvor entleerte PD-10 Hülse mit intakter Bodenfritte. In dieser Hülse wurden zunächst 1 ml Ni-NTA-Suspension (entspricht 0,5 ml Gelbettvolumen) mit 30 ml Lysispuffer äquilibriert. Um schon im Vorfeld das Risiko unspezifisch gebundener Proteine zu minimieren, wurden dem Lysis- und dem Waschpuffer bereits eine geringe Menge des kompetitiven Elutionsmittels Imidazol zugesetzt. Nach Zugabe



des zuvor gewonnenen Proteinrohextraktes zur Suspension wurde für 1 h unter ständigem Rotieren „end-over-end“ an die Matrix gekoppelt. Die Proteinkopplung sowie alle weiteren Schritte erfolgten grundsätzlich bei 4 °C. Der Durchlauf wurde aufgefangen und die Säule 3x mit jeweils 5 ml Waschpuffer gespült. Die NaCl-Konzentration im Waschpuffer wurde mit 1,5M sehr hoch angesetzt, um möglichst stringente Waschbedingungen für eine hohen Reinigungsfaktor zu erzielen. Eluiert wurden Fraktionen zu 1 ml bis das Eluat nach dem Überprüfen mit Bradford-Reagenz (s.Kap. 2.4.1) keine Blaufärbung mehr zeigte. Die einzelnen Elutionsfraktionen sowie der Durchlauf wurden anschließend mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (s.Kap.2.4.2) analysiert. Die reinsten Fraktionen wurden vereinigt, quantifiziert und umgepuffert (s.Kap.2.4.1). Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Die Reinigung der gebrauchten Säule erfolgte durch aufeinander folgendes Spülen mit 30 ml 0,2 M Essigsäure, 30 ml 30 % (m/v) Glycerol und 30 ml Wasser. Bei 4 °C konnte die Ni-NTA-Suspension in 30 % (v/v) Ethanol bis zur nächsten Verwendung gelagert werden.

|                                  | <b>Lysispuffer</b> | <b>Waschpuffer</b> | <b>Elutionspuffer</b> |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| NaCl                             | 300 mM             | 1,5 M              | 300 mM                |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 50 mM              | 50 mM              | 50 mM                 |
| Imidazol                         | 20 mM              | 50 mM              | 250 mM                |
| pH                               | 8                  | 8                  | 8                     |

#### 2.4.4.3 Co-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der HisTag-Proteine über eine Talon<sup>®</sup>-Gelmatrix (Talon<sup>®</sup>, Clontech, BD Bioscience) erfolgte unter Verwendung der in der Herstellervorschrift verwendeten Puffer und Inkubationszeiten in leeren PD-10 Hülse mit Fritte analog der Aufreinigung über Ni-NTA (s.Kap. 2.4.4.2). Das gebrauchte Säulenmaterial wurde zur Regeneration nacheinander mit jeweils 30 ml 20 mM MES-Puffer, mit 0,1 M NaCl und Wasser gespült. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C in 20 % (v/v) Ethanol mit 0,1 % (m/v) Natriumazid.

|                                  | Lysispuffer | Waschpuffer | Elutionspuffer |
|----------------------------------|-------------|-------------|----------------|
| NaCl                             | 300 mM      | 300 mM      | 300 mM         |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 50 mM       | 50 mM       | 50 mM          |
| Imidazol                         | -           | 5 mM        | 150 mM         |
| pH                               | 7           | 7           | 7              |

## 2.5 Immunologische und mikroskopische Techniken

### 2.5.1 Immunisierung

Für die weitergehenden Untersuchungen wurden polyklonale Antikörper gegen die jeweilige HSS der Versuchspflanzen benötigt. Dazu wurde jeweils 1 mg der nach Kapitel 2.4.4 aufgereinigten HSS über eine PD-10 Säule auf 5mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer pH 8 umgepuffert. Das umgepufferte Protein wurde dann in Portionen zu 500 µg und 2x 250 µg aliquotiert, gefriergetrocknet (Gamma 1-20 Gefriertrocknung, Fa Christ) und zur Auftragsimmunisierung an die Firma Bioscience (Göttingen) geschickt. Die Immunisierung des Wirtsorganismus (Kaninchen) erfolgte nach einem standardisiertem Dreimonatsprotokoll, wonach einer Initialimmunisierung mit 500 µg Antigen zwei Auffrischimpfungen mit jeweils 250 µg folgten. Bei späteren Bestellungen wurde der Zeitraum der drei Immunisierungen auf zwei Monate verkürzt (Zweimonatsprotokoll), was bei gleichbleibender Qualität der Antikörper eine Zeitersparnis einbrachte. Unabhängig vom verwendeten Protokoll lieferte die Firma 4 Seren pro Immunisierungsauftrag ab. Dabei handelte es sich zum einen um das Präimmunserum, welches dem Kaninchen vor der Injektion des Antigens abgenommen wurde. Dieses Serum zeigte erwartungsgemäß keine spezifischen Immunreaktionen. Die Testseren „First-Bleeding“ und „Second-Bleeding“ wurden vor den Auffrischungen entnommen und das „Final-Bleeding“, welches die höchste Antigenität aufweisen sollte, wurde zum Abschluß nach allen Immunisierungen entnommen. Die Antigenität der Test- und Antikörperseren wurde im Western-Blot (s.Kap. 2.5.3) überprüft. Die Lagerung der zuvor aliquotierten Seren erfolgte bei -20 °C. Das „Final-Bleeding“ wurde für die nachfolgende Aufreinigung des Antikörpers eingesetzt.

### 2.5.2 Affinitätsreinigung der Antikörper über CNBr-aktivierte Sepharose mit immobilisiertem Protein

Die Aufreinigung des Antikörpers aus dem Serum erfolgte über eine Affinitätschromatographie mit Hilfe des bereits als Antigen eingesetzten Proteins, welches kovalent an eine Gelmatrix gebunden wurde. In einer Antigen-Antikörper-Reaktion band der Antikörper an das fixierte Protein, während die nicht antigenen Bestandteile des Serums durchliefen. Die Bindung wurde durch ein Absenken des pH-Wertes im Elutionsschritt wieder gelöst.

1-5 mg der jeweiligen gereinigten HSS wurden mit Hilfe einer PD-10-Säule auf Koppplungspuffer umgepuffert. 1 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Bioscience) wurde unter dem Abzug mit 1 mM HCl gewaschen und vorgequollen. Nach dem Äquilibrieren der Sepharose mit Koppplungspuffer wurde das Protein zugegeben und für 4 h bei RT auf einem „end-over-end“-Schüttler an die Gelmatrix gekoppelt. Um die Koppplungseffizienz zu bestimmen, wurde jeweils vor und nach dem Koppeln die OD<sub>280</sub> der Proteinlösung vermessen. Anschließend wurde der Puffer verworfen und die Sepharose mit Koppplungspuffer gewaschen bis der Durchlauf eine OD<sub>280</sub> von 0,02 aufwies. Um die noch freien Bindungsstellen der CNBr-aktivierten Sepharose abzusättigen, wurde für 1 h mit Blockpuffer bei RT im „end-over-end“-Schüttler inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Sepharose je 3x mit 10 ml saurem Waschpuffer pH 4,8 und alkalischem Waschpuffer pH 8,8 alternierend gewaschen, um nicht kovalent gebundene Liganden zu entfernen. Letzte Reste der Waschpuffer wurden mit 1xPBS abgespült, bevor die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation für 15 h bei 4 °C mit 1 mg/ml BSA in 1x PBS abgesättigt wurden.

Das BSA wurde durch mehrmaliges Waschen der Säule mit 1x PBS ausgewaschen, bevor 7-8 ml über Glaswolle filtriertes „Final-Bleeding“ auf die Sepharose gegeben wurde. Das vorgeschaltete Filtrieren über Glaswolle soll störende Lipide aus dem Serum entfernen. Das Koppeln des Antikörpers erfolgte für 15 h bei RT auf einem „end-over-end“-Schüttler. Der Durchlauf wurde aufgefangen und konnte für eine erneute Reinigung eingesetzt werden, da die Kapazität der Säule nicht ausreicht, um die gesamten Antikörper auf einmal zu binden. Reste des Serums wurden mit 3x 10 ml 1x PBS ausgewaschen. Der anschließende saure Waschgang mit Waschpuffer pH 4,8 erfolgte bis zu einer meßbaren OD<sub>280</sub> von 0,02. Unter diesen stringenten Waschbedingungen wurden unspezifisch gebundene Antikörper eluiert.

Eluiert wurde der spezifisch gebundene Antikörper mit Elutionspuffer pH 2,8 in Fraktio-

nen zu 1 ml in eine Vorlage aus 150 µl 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8, um ein Denaturieren der Antikörper unter den sauren Bedingungen zu verhindern. Die Elutionsfraktionen wurden sofort photometrisch vermessen und die Fraktionen mit einer  $OD_{280} > 0,1$  wurden vereinigt und wie in Kap. 2.4.1 beschrieben bis auf eine  $OD_{280} > 0,8$  aufkonzentriert. Die endgültige Konzentration jedes aufgereinigten Antikörpers wurde über die Absorption bei 280 nm ermittelt und wird im Ergebnisteil an entsprechender Stelle genannt. Nach Zusatz von 0,02 % (m/v) Natriumazid wurden die Antikörper aliquotiert und bis zum Gebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das gebrauchte Säulenmaterial wurde nach mehrmaligem Waschen mit 1x PBS in 1x PBS mit 0,02 % (m/v) Natriumazid bis zur Wiederverwendung aufbewahrt.

Alle im weiteren Verlauf benutzten polyklonalen Antikörper wurden grundsätzlich nach dieser Vorschrift hergestellt und aufgereinigt.

| <b>Kopplungspuffer</b> | <b>Blockpuffer</b> | <b>Elutionspuffer</b> |
|------------------------|--------------------|-----------------------|
| 0,1 M $\text{NaHCO}_3$ | 0,1 M Tris-Base    | 0,2 M Na-Acetat       |
| 0,5 M NaCl             | pH 8,0             | 0,5 M NaCl            |
| pH 8,3                 |                    | pH 2,8                |

| <b>Waschpuffer pH 8,8</b> | <b>Waschpuffer pH 4,8</b> |
|---------------------------|---------------------------|
| 0,1 M Tris-Base           | 0,1 M Na-Acetat           |
| 0,5 M NaCl                | 0,5 M NaCl                |
| pH 8,8                    | pH 4,8                    |

### 2.5.3 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blot konnten Untersuchungen zur Proteinexpression in den verschiedenen pflanzlichen Geweben durchgeführt werden, welche unter anderem für eine folgende Immunolokalisation (s. Kap. 2.5.5) im Gewebe im Vorfeld notwendig waren. Die HSS wurde dabei mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper nachgewiesen.

### 2.5.3.1 Isolierung von löslichem Gesamtprotein

Die gesammelten und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Pflanzenproben wurden in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerkleinert. Dieses Pulver wurde anschließend in ein vorgekühltes Extraktionsgefäß überführt. Die Extraktion erfolgte dann für 30 min auf Eis in 1x PBS Puffer, welchem 5 % (m/v) Polyclar AT und 2,5 % (m/v) Na-Ascorbat zugesetzt wurde. Der Zusatz von unlöslichem Polyclar AT sollte dabei die störenden Gerbstoffe binden. Zudem wurde die Bildung von quervernetzten Polyphenolen durch die vor allem in Wurzeln vorkommenden Phenoloxidasen durch das antioxidativ wirkende Na-Ascorbat unterbunden. Die Zelltrümmer sowie das Polyclar AT samt der anhaftenden Gerbstoffe wurden durch 30 minütiges Zentrifugieren bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 15300 Upm abgetrennt. Der klare Überstand enthielt das lösliche Gesamtprotein. Nach der Gehaltsbestimmung (s.Kap. 2.4.1) erfolgte die Lagerung des zuvor aliquotierten Proteinextraktes bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.5.3.2 Semi-Dry Elektrophoret

Im Anschluß an die Auftrennung im SDS-Gel (s.Kap. 2.4.2) wurden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore) transferiert. Der Elektrophoret erfolgte nach der Semi-Dry-Methode mit der Multiphor II Nova Blot Elektrophorese Apparatur (Pharmacia) in Verbindung mit dem Multidrive XL (Pharmacia) als Spannungsquelle. Die auf Gelgröße (9x6 cm) zugeschnittene PVDF-Membran wurde zunächst mit Methanol benetzt und anschließend gemeinsam mit dem ebenfalls zugeschnittenen Whatman-Papier in 1x Blotpuffer äquilibriert.

Der Blot wurde dann wie in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt **luftblasenfrei** aufgebaut. Dabei wurde beim Aufbau besonders darauf geachtet, daß alle Schichten gut mit 1x Blotpuffer befeuchtet waren. Der Transfer erfolgte dann für 1 h bei einer Stromstärke von 120 mA für ein Gel bzw. 160 mA für zwei Gele.

| 10x Blotpuffer |              | 1x Blotpuffer  |             |
|----------------|--------------|----------------|-------------|
| Tris-Base      | 58,0 g       | 10x Blotpuffer | 10,0 ml     |
| Glycin         | 29,0 g       | Methanol       | 20,0 ml     |
| SDS            | 3,7 g        | Wasser         | ad 100,0 ml |
| Wasser         | ad 1000,0 ml |                |             |



**Abbildung 2.1:** Aufbau Western Blot

### 2.5.3.3 Detektion, Exposition und Dokumentation

Die Membran wurde nach Abbau des Blots für 1 h in einer Lösung von 5 % (m/v) Trockenmilchpulver (Blotting Grade, Roth) in 1x TBS-T geschwenkt, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Die Lösung wurde erneuert und die Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen HSS-Antikörper erfolgte in dieser Blocklösung für 1 h unter leichtem Schütteln. Der affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper wurde dazu, soweit nicht anders erwähnt, in einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt. Reste des primären Antikörpers wurden durch dreimaliges Waschen mit 1x TBS-T für jeweils 7 min abgewaschen. Zum Einsatz kam im Rahmen der immunologischen Untersuchungen als sekundärer Antikörper ein aus Ziege gewonnener Antikörper, der gegen Kaninchenantikörper gerichtet und mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert ist. (Goat-Anti-Rabbit-Antikörper, Dianova). Die Inkubation mit dem 1:3300 verdünnten sekundären Antikörper erfolgte für 45 min. Nach drei folgenden Waschschritten mit TBS-T für 7 min wurde die Membran zur Vorbereitung auf die Detektion mit 1x PBS konditioniert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Kit (Amersham Biosciences) nach Herstellervorschrift. Dabei kommt es zu einer oxidativen Spaltung des zugesetzten Substrates Luminol durch die mit dem sekundären Antikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase, wobei Licht emittiert wird, welches auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden kann. Dazu wurde die Membran für 1 min mit einem Gemisch aus je 1 ml Lösung I und 1 ml Lösung II aus dem Kit inkubiert und anschließend zwischen 2 passend zurecht geschnittenen Overheadfolien fi-

xiert. Die Exposition eines Röntgenfilms (X-OMAT, XAR-5, Kodak) variierte je nach Stärke des Signals zwischen 1 und 10 min und wurde empirisch ermittelt. Zum Schluß wurden die Filme mit RP X-OMAT developer/replenisher (Kodak) entwickelt und mit RP X-OMAT L0 fixer/replenisher (Kodak) fixiert.

Die PVDF-Membran wurde nach der immunologischen Detektion mit Indian-Ink angefärbt (s. Kap. 2.4.3.2), um den Proteintransfer zu kontrollieren und den zugesetzten Größenmarker sichtbar zu machen.

| <b>10x TBS</b>                   |                      | <b>1x TBS-T</b> |             |
|----------------------------------|----------------------|-----------------|-------------|
| NaCl                             | 80,0 g               | 10x TBS         | 50,0 ml     |
| Tris-Base                        | 30,0 g               | Tween-20        | 0,5 g       |
| KCl                              | 2,0 g                | Wasser          | ad 500,0 ml |
| Wasser                           | ad 1000,0 ml, pH 8   |                 |             |
| <b>10x PBS</b>                   |                      | <b>1x PBS</b>   |             |
| NaCl                             | 80,0 g               | 10x PBS         | 50,0 ml     |
| KCl                              | 2,0 g                | Wasser          | ad 500,0 ml |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 14,4 g               |                 |             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2,4 g                |                 |             |
| Wasser                           | ad 1000,0 ml, pH 7,2 |                 |             |

#### 2.5.4 Dotblot

Um die einzubettenden Proben im Vorfeld schnell auf exprimierte HSS zu untersuchen, wurde ein zuvor gewonnener Proteinextrakt im Dotblot untersucht. Dabei handelt es sich um eine abgewandelte Form des Western Blot, wobei auf eine vorgeschaltete Auftrennung der Proteine im SDS-Gel verzichtet wird.

Die Extraktion des löslichen Gesamtproteins erfolgte dabei wie in Kapitel 2.5.3.1 beschrieben. Gefällt wurden jeweils 5-10 µg Protein für 10 min bei Raumtemperatur (s. Kap. 2.4.1). Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 4 °C mit 15300 Upm wurde das erhaltene Pellet in 4 µl 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8 resuspendiert und direkt auf die unbehandelte Nitrocellulose-Membran (Hybond-C, Amersham) aufgetropft. Dabei wurde besonders darauf geachtet, daß die Pipettenspitze keinen Kontakt zur empfindlichen Membran hat. Zusätzlich wurde die jeweilige affinitätsgereinigte HSS als Positivkontrolle in Konzentrationen von 10-100 ng aufgebracht. Als Negativkontrolle diente ein unter gleichen

Bedingungen gewonnener Proteinextrakt aus einem Pflanzenteil, der zuvor im Western Blot kein Signal gezeigt hatte.

Die weitere Detektion, Exposition und Dokumentation erfolgte wie in Kapitel 2.5.3.3 beschrieben.

### 2.5.5 Präparation und Immunodetektion von Kunstharzschnitten

Für die Immunolokalisation der HSS im pflanzlichen Gewebe war es notwendig, frisches Pflanzenmaterial zu fixieren und in geeignete Kunststoffe einzubetten. Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen erwies sich dabei der Kunststoff Technovit 7100 (Heraeus Kulzer) als optimales Medium, da er sich durch seine guten Schneideigenschaften und die Möglichkeit zur schonenden kalten Polymerisation auszeichnet. Die Präparation der Gewebe für die Elektronenmikroskopie erfolgte in dem Kunstharz Unicryl (British Biocell International).

#### 2.5.5.1 Fixierung der pflanzlichen Gewebe

Für die Präparation der pflanzlichen Gewebe war es notwendig, diese zuvor zu fixieren, um die Zellstrukturen zu erhalten. Die Fixierung erfolgte grundsätzlich auf Eis in einem Fixierpuffer pH 7,2 (s. unten). Dieser Puffer enthielt als fixierende Komponenten die proteinquervernetzenden Aldehyde p-Formaldehyd (2 % (m/v) ) und Glutardialdehyd (0,1 % (v/v) ). Zusätzlich wurden dem Puffer 0,1 % (m/v) Triton-X100 zugesetzt, um ein besseres Infiltrieren des Fixativs in das pflanzliche Gewebe zu ermöglichen. Ein Zusatz von 2,5 % (m/v) Na-Ascorbat unmittelbar vor Beginn der Probenaufbereitung als Antioxidans sollte die Bildung von Polyphenolen durch die hauptsächlich in Wurzeln vorkommenden Phenoloxidasen verhindern.

Frische Wurzelproben von *Cynoglossum officinale*, *Symphytum officinale* und *Senecio jacobaea* wurden unmittelbar nach dem Ernten in kalte Fixierlösung überführt. Die Fixierung erfolgte grundsätzlich für 2 h auf Eis unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) , um die Diffusion des Fixiermediums in das Gewebe zu beschleunigen. Dabei wurde bei den Wurzelproben darauf geachtet, daß das Vakuum nicht über -0,3 bar anstieg, damit das empfindliche Wurzelgewebe nicht beschädigt wurde. Im Verlauf der Fixierung wurde das Fixativ mehrfach gewechselt, um Verluste durch ein Abdampfen im Vakuum zu kompensieren. Im Anschluß an die 2 Stunden wurden die Reste des Fixiermediums durch zweimaliges Waschen für jeweils 10 min mit 1x PBS auf dem Schüttler ausgewaschen und



die Proben konnten direkt für die Entwässerung und die Infiltration mit dem Kunstharz verwendet werden.

Blatt- und Sproßproben von *Heliotropium indicum* wurden wie oben beschrieben inkubiert, nur daß hier auf Grund der morphologischen Strukturen das Vakuum höher (bis -0,8 bar) angelegt wurde. Da bei diesen oberirdischen Gewebeproben keine aus phenolischen Oxidationsprodukten resultierende Braunfärbung beobachtet wurde, konnte hier auf den Zusatz von Na-Ascorbat im Fixierpuffer verzichtet werden. Alle Proben wurden im Vorfeld mit einer Rasierklinge auf die gewünschte Größe für spätere Längs- und Querschnitte zugeschnitten.

**Fixierpuffer pH 7,2** 2 g p-Formaldehyd (toxisch!) wurden unter dem Abzug eingewogen und mit Wasser auf 45 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von einem Plätzchen NaOH wurde die Lösung unter ständigem Rühren auf ca. 60 °C erwärmt, bis sich das Formaldehyd vollständig gelöst hatte. Die Alkalisierung der Lösung durch Zusatz von NaOH verbesserte die Löslichkeit des Formaldehyds. Anschließend erfolgte eine Einstellung des pH-Wertes mit 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf den Bereich 6-8. Nach Zusatz von 10 ml 1x PBS wurde mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Der abgekühlten Lösung wurden abschließend 0,1 % (v/v) Glutardialdehyd und 0,1 % (m/v) Triton X-100 zugesetzt. Die Lagerung der Fixierlösung erfolgte unter Lichtausschluß bei 4 °C über einen Zeitraum von einem Monat. Das antioxidativ wirkende Na-Ascorbat wurde kurz vor Beginn der Präparation frisch in einer Konzentration von 2,5 % (m/v) zugesetzt.

Alternativ wurde ein Fixierpuffer mit 4 % (m/v) p-Formaldehyd und unter Verzicht von Glutardialdehyd in analoger Weise hergestellt und verwendet.

#### 2.5.5.2 Einbettung in Technovit 7100 für die Lichtmikroskopie

Die gewaschenen und fixierten Proben (s. Kap. 2.5.5.1) wurden zunächst in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30, 50, 70, 90, 100 %) für jeweils 30 min entwässert, wobei die letzte Stufe 2x wiederholt wurde, um eine quantitative Entwässerung zu erzielen. Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen mit FITC und Immunogold wurden die Proben grundsätzlich in den Kunststoff Technovit 7100 (Heraeus Kulzer) eingebettet. Dieser kalt polymerisierende Kunststoff zeichnet sich vor allem durch eine schnelle Polymerisation in Verbindung mit einer sehr guten Schneidefähigkeit aus. Für die Präinfiltration

wurde das Kunstharz mit Ethanol (100%) zu gleichen Teilen gemischt und die Proben für 30 min in dieser Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Infiltration mit dem Kunstharz für 60 min, bevor die Proben über Nacht in einer Lösung von Härter I in T7100 (1 g Härter I / 100 ml T7100) inkubiert wurden. Die Auspolymerisation der Wurzelproben erfolgte in kleinen dünnwandigen PCR-Gefäßen in der gleichen, frisch angesetzten Mischung von Härter I und T7100, der als Radikalstarter Härter II zugesetzt wurde (15 ml Härter II / 100 ml Lösung). Nach dem Aushärten des Kunststoffes bei RT wurden die Proben mit Technovit 3040 (Heraeus Kulzer) aufgeblickt und bis zum Schneiden am Mikrotom im Exsikkator gelagert, um die noch vorhandene Restfeuchte zu entfernen. Größere Blatt- oder Sproßproben sowie Längsschnitte von Wurzeln wurden in einer speziellen Teflonform ausgegossen (Histoform-S, Heraeus Kulzer). Die Proben konnten dann mit Hilfe eines Kunststoffträgers (Histobloc, Heraeus Kulzer) beim Aufblocken mit Technovit 3040 der Form entnommen werden. Die Lagerung dieser Blöckchen erfolgte ebenfalls im Exsikkator.

### 2.5.5.3 Einbettung in Unicryl für die Elektronenmikroskopie

Da der Kunststoff Technovit 7100 sich auf Grund seiner Materialeigenschaften nicht für die Bedingungen der Elektronenmikroskopie eignet, wurden die entsprechenden Proben in Unicryl (British Biocell International) eingebettet. Dieser extrem harte Kunststoff kann am Ultramikrotom geschnitten werden und hält dem Elektronenstrahl im Elektronenmikroskop stand. Der Nachteil ist seine spröde Beschaffenheit und die daraus resultierenden Schwierigkeiten beim Schneiden.

Zur Präinfiltration wurden die fixierten und entwässerten Proben (s. Kap. 2.5.5.1 und Kap. 2.5.5.2) für jeweils 30 min nacheinander in einer 3:1, 1:1 und 1:3 Mischung aus Ethanol und Unicryl inkubiert. Die Infiltration mit dem reinen Kunstharz erfolgte dann zunächst für 2x 60 min bei RT und nach Erneuern der Lösung für weitere 15 Stunden bei RT. Zum Ausgießen der Proben wurden die gleichen Gefäße verwendet wie für die oben beschriebene Einbettung in T7100. Die Auspolymerisation erfolgte grundsätzlich bei 4 °C unter UV-Licht über einen Zeitraum von mehreren Tagen. Die ebenfalls technisch mögliche Polymerisation des Kunststoffes bei 55 °C wurde nicht verwendet, da eine merkliche Verringerung der Antigenität durch das mehrtägige Erwärmen auf 55 °C zu erwarten war. Die Kaltpolymerisation erfolgte unter 28 W-Schwarzlichtröhren (Conrad) in einem empirisch ermittelten Abstand von 7 cm. Als Halterung und Spannungsquelle

für die Röhren diente ein Lampensockel einer Universal-UV-Lampe (Camag).

Abschließend wurden die Proben mit dem Kunststoff Technovit 3040 aufgeblockt und bei RT bis zum Schneiden gelagert. Die in Unicryl eingebetteten Proben wurden nicht im Exsikkator aufbewahrt, da der Kunststoff unter weiterem Wasserentzug zur Versprödung neigt.

#### 2.5.5.4 Schneiden der Gewebeblöckchen

Die auspolymerisierten Kunststoffblöckchen wurden an einem Rotationsmikrotom (HM 355S, Microm) unter Verwendung von Einwegklingen (Histoknife H, Heraeus Kulzer oder SuperLab, Microm) geschnitten. Dabei wurde die Schnittgeschwindigkeit dem jeweiligen Kunststoff angepaßt: Der sehr harte Kunststoff Unicryl wurde langsamer geschnitten ( $v=3-4$ ) als der wesentlich weichere Kunststoff T7100, der auch noch bei höheren Geschwindigkeiten ( $v=6-8$ ) gute Schnitte ermöglichte. Die Blöckchen wurden dazu entweder in einen Rundprobenhalter oder aber im Fall der an den Träger Histobloc fixierten Proben direkt in einen passenden Kassetttenhalter eingespannt. Die Schnittdicke betrug unabhängig vom verwendeten Kunststoff  $3-4\text{ }\mu\text{m}$ .

Die Schnitte wurden dann mit Hilfe eines Wassertropfens auf speziell beschichtete Objektträger aufgebracht. Für Querschnitte kamen mit teflon- und adhäsivbeschichtete Objektträger zum Einsatz. Dabei ermöglicht die Teflonbeschichtung eine optimale Inkubation der aufgebrachten Proben, da der Tropfen durch das hydrophobe Teflon in seiner Position gehalten wird und nicht über den Objektträger verläuft. Für größere Proben und Längsschnitte wurden die ebenfalls adhäsivbeschichteten Objektträger Superfrost (Menzel) verwendet. Nach dem Aufziehen wurden die Schnitte an der Luft getrocknet und bis zur Immunodetektion bei RT gelagert.

#### 2.5.5.5 FITC-Markierung für die Fluoreszenzmikroskopie

Zunächst wurden die störenden Reste der aus der Fixierlösung stammenden Aldehyde durch eine jeweils 20 minütige Inkubation mit zunächst 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und anschließend 50 mM Glycin bei  $37^\circ\text{C}$  gebunden. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen abgeblockt. Dazu wurden die Schnitte für 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit einer Lösung von 10 % (m/v) BSA und 0,1 % (v/v) aufgeschmolzener Fischgelatine inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte mit 1x PBS für 10 min auf dem Schüttler erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper. Inkubiert wurde in den Verdün-

nungen 1:50 und 1:100 in 1x PBS wahlweise für entweder 4 h bei 37 °C oder für 15 h bei 4 °C.

Der primäre Antikörper wurde im Rahmen der Spezifitätsuntersuchungen (s. Kap. 3.1.4.1, 3.2.5.1, 3.3.5, 3.3.7 und 3.4.2) vor der Schnittinkubierung mit dem jeweiligen Kontrollprotein für 15 min auf Eis vorinkubiert, kurz abzentrifugiert, auf den Schnitt pipettiert und wie o.a. weiterinkubiert.

Die Reste des primären Antikörpers wurden durch dreimaliges Waschen für 10 min mit 1x PBS abgewaschen. Als sekundärer Antikörper kam zum einen ein Goat anti Rabbit Antikörper der Firma Sigma zum Einsatz, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert ist. Dieser Farbstoff wird durch Absorption von Licht der Wellenlänge 495 nm angeregt und emittiert dann ein grünes Licht bei 514 nm. Ein Nachteil dieses Farbstoffs ist die starke pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz sowie vor allem das sehr schnelle Ausbleichen unter Bestrahlung. Aus diesem Grund wurde als alternativer sekundärer Antikörper der Goat anti Rabbit Antikörper AlexaFluor<sup>®</sup>488 (Molecular Probes, Invitrogen) eingesetzt, der sich durch eine stärkere Fluoreszenz und eine verminderte Tendenz zum Ausbleichen auszeichnet. Das Anregungs- und Emissionsspektrum deckt sich dabei mit dem bereits etabliertem FITC, so daß die vorhandenen Filtersätze am Mikroskop genutzt werden konnten. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 60 min bei 37 °C unter Lichtausschluß. Nach drei Waschgängen mit 1x PBS für jeweils 20 min unter Lichtausschluß wurden die Schnitte an der Luft getrocknet. Um ein Ausbleichen der Markierung unter UV-Licht zu verzögern, wurden die Schnitte mit einem speziellen Mounting Medium (Citifluor, Agar Scientific) geschützt.

Die Betrachtung und Auswertung der Schnitte erfolgte grundsätzlich am Epifluoreszenzmikroskop Axioskop II plus (Zeiss). Der Filtersatz bestand aus einem FITC-Filter, einem Rot-Filter und einem kombinierten Langpaß-Filter, der sowohl die grüne Fluoreszenz der Markierung als auch die rote Autofluoreszenz von bestimmten pflanzlichen Geweben passieren ließ. Räumliche Strukturen konnten im Durchlicht durch Differentialinterferenzkontrast (DIC) dargestellt werden. Mit Hilfe der Software AxioVision 3.0 (Zeiss) konnten somit Dreikanalbilder bestehend aus der Markierung, der Autofluoreszenz sowie der räumlichen Struktur der betrachteten Zellen erstellt und dokumentiert werden.

Für die Aufnahmen unter Verwendung von Ölimmersionsobjektiven wurde ein spezielles Immersionsöl (Immersol 518F, Zeiss) verwendet, welches zuvor bei 60 °C im Wasserbad bis zur klaren Lösung geschmolzen wurde.

### 2.5.5.6 Immunogold-Markierung für die Lichtmikroskopie

Die Inkubation der Schnitte erfolgte bis zur Zugabe des sekundären Antikörpers wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben. Als sekundärer Antikörper kam ein mit 18 nm Goldpartikeln konjugierter Goat anti Rabbit Antikörper (Dianova) in einer 1:50 Verdünnung in 1x PBS zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37 °C. Nach drei Waschgängen für 3 min mit 1x PBS erfolgte die Detektion mit dem IntenSE M Silver-Enhancement-Kit (Amersham Biosciences). Dazu wurden nach Herstellervorschrift die Lösungen A und B zu gleichen Teilen gemischt und auf den Schnitt gegeben. Dabei lagert sich das in der Detektionslösung enthaltene Silber an die Goldpartikel der Markierung an, was unter dem Mikroskop im Durchlicht als eine Schwärzung der betroffenen Gewebe sichtbar wird. Diese sollte unmittelbar bis spätestens 20 min nach Inkubation sichtbar werden, da spätere Schwärzungen auch aus unspezifisch ausfallendem Silber resultieren können. Nach Auftreten der Färbung wurde die Reaktion sofort durch Spülen der Schnitte mit Wasser beendet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte am Axioskop II plus (Zeiss) im Hell- und Dunkelfeld wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben.

### 2.5.5.7 Immunogold-Markierung für die Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Schnitte auf zuvor beschichtete Nickelgrids (100 und 300 mesh, Plano) aufgezogen. Das Beschichten der Nickelgrids mit einer 2 %igen (m/v) Butvar-Lösung (Butvar B98, Sigma) in Chloroform erfolgte nach einer Vorschrift von Handley und Olsen (1979), die von Moll (2002) leicht modifiziert wurde. Dazu wurden 50 ml der Butvar-Lösung in einen 250 ml Scheidetrichter überführt. In diese Lösung wurde ein zuvor mit Ethanol gereinigter Objektträger (Menzel) mit Hilfe einer an einen Bindfaden befestigten Klammer eingehängt und die Lösung wieder abgelassen. Dabei bildete sich ein dünner, gleichmäßiger Film auf dem Objektträger. Nach dem Anritzen des Films mit einem Glasmesser an den Kanten des Objektträgers wurde der Objektträger schräg in ein Wasserbad eingetaucht, um den Film unter Ausnutzung der Oberflächenspannung des Wassers vom Objektträger abzulösen. Anschließend wurden die Nickelgrids mit der matten Seite nach oben auf den schwimmenden Film aufgebracht. Der gesamte Film wurde dann mit der rauhen Seite eines Trennblattes von Parafilm aufgenommen und in einer Petrischale getrocknet. Die beschichteten Grids wurden in dieser Petrischale bis zur Benutzung bei RT gelagert.

Vor dem Schneiden am Ultramikrotom wurden die Gewebeblöckchen unter einer Stereo-

lupe (Stemi, Zeiss) mit einer Rasierklinge zu einer Pyramide mit trapezförmiger Grundfläche getrimmt. Von den getrimmten Proben wurden dann mit einem Glasmesser am Ultramikrotom (Ultracut, Reichert-Jung, Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig) 80 nm dünne Schnitte erzeugt, die auf die mit Butvar beschichteten Nickelgrids übertragen wurden.

Die Inkubation der Nickelgrids erfolgte analog Kapitel 2.5.5.5 mit dem Unterschied, daß sämtliche Inkubationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt wurden. Zu diesem Zweck wurde ein Tropfen der entsprechenden Inkubationslösung auf ein Stück Parafilm pipettiert und die Nickelgrids mit der Schnittseite nach unten auf den Tropfen aufgebracht. Alle weiteren Waschschrte und Inkubationen mit dem jeweiligen primären Antikörper in den verschiedenen Konzentrationen sowie mit dem sekundären Goldkonjugiertem Goat anti Rabbit Antikörper erfolgten wie in Kapitel 2.5.5.6 beschrieben mit dem Unterschied, daß auf die Anlagerung von Silber durch das „silver enhancement“ verzichtet wurde.

Zur Nachkontrastierung wurde die Elektronendichte des pflanzlichen Gewebes durch eine 30 minütige Inkubation mit 2 %iger (m/v) Uranylacetat-Lösung erhöht. Nach 2 Waschschrten mit Wasser für jeweils 10 min wurden die Grids an der Luft getrocknet und bis zur Auswertung bei RT gelagert. Die Auswertung und Dokumentation der Schnitte erfolgte am Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM, Phillips 300 EM, Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig).

Zur Dokumentation wurden Scientia EM Filme (Agfa) verwendet, die anschließend mit Eukobrom (Tetanal) entwickelt und mit Superfix (Tetanal) fixiert wurden. Abzüge wurden digital am Computer nach dem Einscannen der Negative erzeugt.

### 3 Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung dargelegt wurde, ist die im Sekundärstoffwechsel verankerte HSS durch Genduplikation unter dem Selektionsdruck der Herbivorie aus der DHS, einem Enzym des Primärstoffwechsels hervorgegangen. Diese Rekrutierung erfolgte innerhalb der Angiospermen mehrfach unabhängig voneinander. Beide Enzyme weisen einen praktisch identischen Reaktionsmechanismus auf, sind aber an vollkommen unterschiedlichen biologischen Prozessen beteiligt, was eine komplexe und sensitive Regulation der beiden Enzyme voraussetzt.

Um diese Regulation besser verstehen zu können, wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit vergleichende Expressionsanalysen der HSS mit ihrem phylogenetischen Vorfahr der DHS in *Senecio vernalis* (Asteraceae, Tribus Senecioneae) und *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae, Tribus Eupatorieae) durchgeführt (Moll et al., 2002; Anke et al., 2004), wobei die HSS in beiden Gattungsgruppen unabhängig voneinander entstanden ist. Die dabei gesammelten Erfahrungen konnten nun auf die Familie der Boraginaceae angewendet werden, um hier ebenfalls die gewebespezifische Lokalisation der HSS zu charakterisieren, was besonders interessant erschien, da Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe auf einen monophyletischen Ursprung der HSS innerhalb dieser Familie schließen lassen (Reimann et al., 2004).

Die Untersuchung der Expression und der Vergleich mit den bestehenden Daten zur Expression der HSS in verschiedenen Angiospermen sollten aufzeigen, ob sich dieser monophyletische Ursprung in der gewebe- und zellspezifischen Lokalisation widerspiegelt.

#### 3.1 Gewebespezifische Expression der HSS in *Cynoglossum officinale*

Biochemische Untersuchungen an der zweijährigen Pflanze *Cynoglossum officinale* haben gezeigt, daß bei jungen Keimlingen sowohl die isolierte Wurzel als auch der isolierte Sproß zur Bildung von Homospermidin befähigt ist (Van Dam et al., 1995b).

Weitergehende molekularbiologische Untersuchungen mit Hilfe der RT-PCR bestätigten

größtenteils diese Ergebnisse. So fanden sich bei der einjährigen Pflanze Transkripte der HSS in der jungen Wurzel und im Blatt, wohingegen das *hss*-Gen in der zweijährigen Pflanze in der jungen Wurzel, im jungen Blatt und in der Knospe transkribiert wurde (Reimann, 2007). Das Ergebnis der RT-PCR wurde bei der Auswahl der Gewebe für den Western Blot und die anschließende Immunolokalisation berücksichtigt, um die Transkription mit der Expression auf Proteinebene vergleichen zu können.

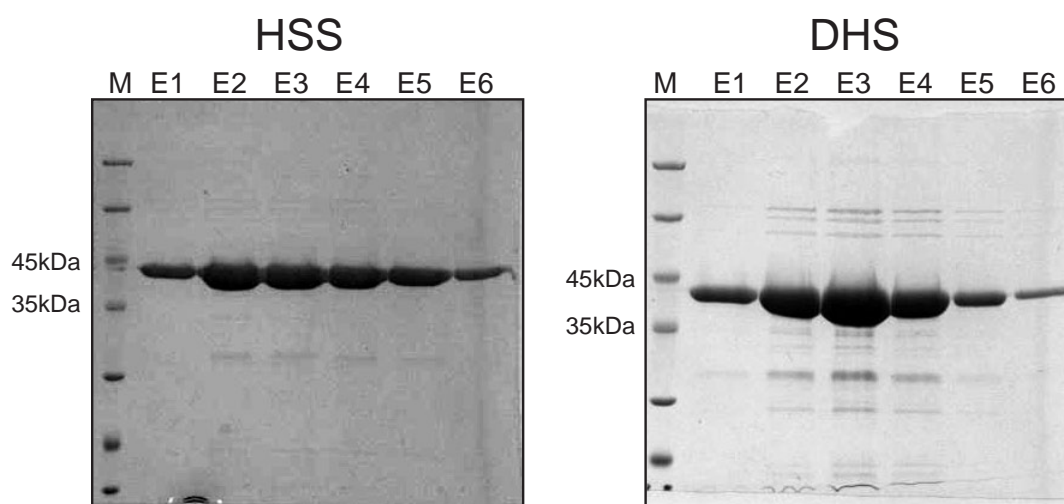
Zunächst wurde die heterolog in *E. coli* exprimierte HSS aufgereinigt, um den für die immunologischen Versuche benötigten spezifischen, polyklonalen Antikörper gewinnen zu können.

### 3.1.1 Reinigung der rekombinanten HSS und DHS aus *Cynoglossum officinale*

Das für die Überexpression der HSS mit einem 6x His-Tag zwecks Gewinnung des Antikörpers benötigte Konstrukt lag zu Beginn dieser Arbeit bereits vor und wurde wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben heterolog im Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und anschließend mit Hilfe der Ni-NTA (s. Kap. 2.4.4.2) metallaffinitätschromatographisch in einem Schritt aufgereinigt (Abb. 3.1). Das bereits vorhandene Konstrukt wurde durch Ligation in den linearisierten Vektor pET3a über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Nde*I hergestellt (Reimann, 2007). Um eine mögliche Kreuzreaktivität des spezifischen HSS-Antikörpers mit der DHS zu untersuchen, wurde aufgereinigte DHS benötigt. Da die bereits im Vorfeld dieser Arbeit klonierte DHS aus *C. officinale* nicht über den für die Aufreinigung mit Hilfe der Ni-NTA benötigten His-Tag verfügte, wurden an die bereits bekannte Sequenz durch PCR 6 Histidin-Reste am C-Terminus angefügt. Dazu wurde ein neuer Reverse-Primer (s. Tab. 2.1) entworfen und gemeinsam mit dem bereits vorhandenen Expressions-Forward-Primer (s. Tab. 2.1) für die PCR benutzt (s. Kap. 2.3.1.1). Das erhaltene PCR-Produkt wurde aufgereinigt und wie auch der verwendete pET3a-mod- Vektor zuerst mit dem Restriktionsenzym *Xho*I und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten. Die so erhaltenen „sticky-ends“ von PCR-Produkt und Vektor wurden anschließend miteinander ligiert (s. Kap. 2.3.3.1). Das dabei neu entstandene Konstrukt wurde im weiteren Verlauf wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben in *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen transformiert. Im Anschluß an die Selektion durch das Antibiotikum Ampicillin wurden die gewachsenen Klone in einem PCR-Screening (s. Kap. 2.3.4.2) auf erfolgreich inserierte DHS cDNA untersucht. Von den als positiv getesteten Proben wurde die Plasmid-DNA isoliert (s. Kap. 2.3.5) und in den Expressionsstamm



*E. coli* BL21 (DE3) transformiert (s. Kap. 2.3.4). Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG. Nach erfolgreicher heterologer Expression konnte die DHS wie oben für die HSS beschrieben unter Verwendung der Ni-NTA in einem Schritt bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt werden (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1: Aufreinigung der rekombinanten HSS und DHS aus *C. officinale*.** Gezeigt werden die Coomassie-gefärbten SDS-Gele nach der metallaffinitätschromatographischen Aufreinigung. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der Elutionsfraktionen (E1-E6). M= 14,4-116 kDa Proteinleiter (Fermentas)

### 3.1.2 Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die DHS im Western Blot

Da die HSS aus *Cynoglossum officinale* mit 74 % auf Aminosäureebene eine hohe Identität zur DHS aufweist, konnten Kreuzreaktionen des HSS-Antikörpers mit der DHS nicht ausgeschlossen werden. Um falsch positive Signale im Western Blot oder bei den späteren Immunolokalisationen auf zellulärer Ebene zu verhindern, wurde der aufgereinigte Antikörper im Western Blot gegen die aufgereinigte rekombinante DHS auf Kreuzreaktivität überprüft.

Zu diesem Zweck wurden gleichartige Verdünnungsreihen von HSS und DHS in einem SDS-Gel aufgetrennt (s. Kap. 2.4.2) und auf eine PVDF-Membran geblottet (s.

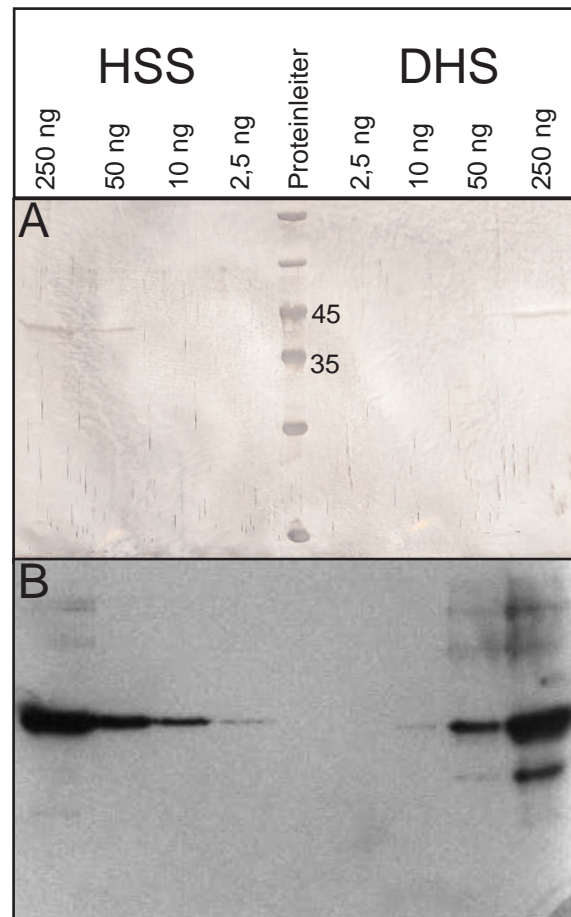
Kap. 2.5.3). Die Membran wurde zunächst mit dem spezifischen HSS-Antikörper detektiert (s. Kap. 2.5.3.3) und anschließend mit Indian-Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt, um zu überprüfen, ob im SDS-Gel vergleichbare Mengen an Protein aufgetragen wurden (Abb. 3.2 A).

Die mit dem Antikörper inkubierte Membran (Abb. 3.2 B) zeigt, daß die DHS bis zu einer Konzentration von 50 ng und die HSS bis 2,5 ng erkannt wurde. Dabei entsprach die 50 ng Bande der DHS in Bezug auf ihre Intensität der 10 ng Bande der HSS. Der Antikörper detektierte also unter der Voraussetzung, daß gleiche Konzentrationen von DHS und HSS aufgetragen werden, die HSS um den Faktor 5 empfindlicher als die DHS. Auf Grund dieser Kreuzreaktivität waren im Rahmen der Immunolokalisation (s. Kap. 3.1.4) weitere Nachweise z.B. durch Unterfütterungsversuche notwendig, um die Spezifität der erhaltenen Antikörpermarkierung eindeutig zu belegen.

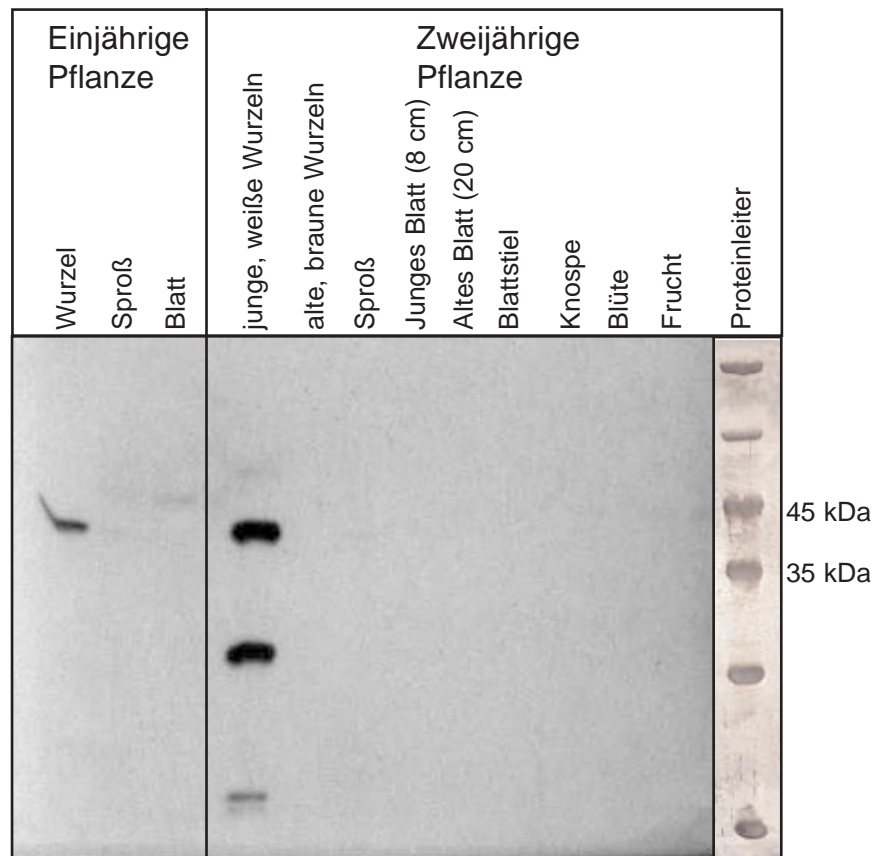
### 3.1.3 Expressionsanalyse durch Western Blot

Mit dem Western Blot sollten nach den Transkriptionsanalysen durch RT-PCR (Reimann, 2007) die gleichen Gewebe auf eine Expression des HSS-Proteins untersucht werden, um die Ergebnisse zu vergleichen und die Gewebe für eine Einbettung mit anschließender Immunolokalisation auszuwählen.

Bei der zweijährigen Pflanze wurde zusätzlich zwischen jungen und alten Wurzeln unterschieden. Dabei handelte es sich bei den jungen Wurzeln um die weißen, frischen Wurzeln, die mit dem Beginn der Vegetationsperiode neu austreiben, wohingegen die alten Wurzeln aus den bräunlich verfärbten, dickeren Wurzeln des Vorjahres bestanden. Wie in der Abb. 3.3 zu erkennen ist, wurde bei der einjährigen Pflanze nur in den Wurzeln die HSS-spezifische Bande detektiert. Die Transkription der HSS im Blatt der einjährigen Pflanze konnte auf Proteinebene ebenso wenig bestätigt werden wie die biochemischen Untersuchungen, die eine Synthese von Homospermidin im isolierten Sproßsystem von Keimlingen aufgezeigt haben. Eine mögliche Ursache für die damals von Van Dam (1995) gezeigte Synthese der HSS im isolierten Sproß könnten Reste des nicht vollständig entfernten Wurzelsystems oder eine lokal sehr begrenzte Expression der HSS sein. Im Falle einer auf nur wenige Zellschichten begrenzten Expression könnten dann Verdünnungseffekte dafür verantwortlich sein, daß im Western Blot eines größeren Gewebestücks kein Signal detektiert wurde. Zur weiteren Aufklärung wurden die Keimlinge noch einmal genauer im Western Blot untersucht (s. Kap. 3.1.3.1).



**Abbildung 3.2:** Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die HSS und DHS aus *C. officinale* im Western Blot. Jeweils gleiche Mengen von HSS und DHS wurden im SDS-Gel (s. Kap. 2.4.2) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. Kap. 2.5.3). Die PVDF-Membran wurde nach Kap. 2.5.3.3 nacheinander mit dem spezifischen HSS Antikörper ( $OD_{280}=1,32$ ) in einer 1:10000 Verdünnung und dem sekundären Antikörper (1:3300) inkubiert und anschließend mit dem ECL-Kit (**B**) detektiert. Im Anschluß daran wurde die Membran mit Indian-Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt (**A**). Zur Identifizierung der Banden wurde zusätzlich ein 14,4-116 kDa Proteinmarker (Fermentas) aufgetragen.



**Abbildung 3.3: Western Blot verschiedener Gewebe von *C. officinale*.** Jeweils 20 µg isoliertes Gesamtprotein aus den Geweben wurde im SDS-Gel (s. Kap. 2.4.2) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. Kap. 2.5.3). Im Anschluß an die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:10000, OD<sub>280</sub>=1,32) und dem sekundären Antikörper (1:3300) erfolgte die Detektion mit dem ECL-Kit (s. Kap. 2.5.3.3). Der Größenmarker (14,4-116 kDa, Fermentas) wurde nach dem Blotten von der Membran abgetrennt und mit Indian Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt, um die Größe der Banden abschätzen zu können.

In der zweijährigen Pflanze wurde die HSS nur in den jungen, weißen, frisch austreibenden Wurzeln detektiert. In den alten Wurzeln sowie in allen untersuchten oberirdischen Organen konnte keine Expression der HSS nachgewiesen werden. Beim Vergleich mit der RT-PCR wird deutlich, daß der im Vergleich zur jungen Wurzel wesentlich schwächere Expressionslevel der Transkripte im jungen Blatt und in der Knospe nicht oder nicht stark genug für eine Detektion der Proteine mit dem Western Blot waren. Daß die Proben für die RT-PCR und den Western Blot zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt wurden, könnte auch ein Grund für die beobachtete Diskrepanz zwischen Transkription und Protein-Expression sein. Hier wäre es in der Zukunft noch einmal interessant, die RT-PCR und den Western Blot mit den gleichen Geweben durchzuführen, um die Ergebnisse dann direkt miteinander vergleichen zu können.

Eine Auffälligkeit im Western Blot war das Auftreten von drei Banden in der jungen Wurzel der zweijährigen Pflanze. Dieses Bandenmuster trat auch bei anderen Untersuchungen zur Expression der HSS reproduzierbar auf, so daß es sich hierbei nicht um eine unspezifische Reaktion des Antikörpers handeln konnte. Eine genaue Betrachtung der Banden ergab den Verdacht, daß es sich bei den beiden kleineren Banden um Spaltprodukte der HSS handelt, die vermutlich während der Extraktion als Artefakt durch Proteasen entstanden sind. Ein Addieren der Bandengröße von ca. 18 kDa und 26 kDa ergibt die ursprüngliche Bande von 44 kDa der HSS. Eine daraufhin durchgeführte Untersuchung (s. Kap. 3.4.6) hat ergeben, daß der Abbau durch Zusatz von Proteinase-Hemmstoffen verhindert werden kann, was ein zusätzlicher Hinweis für den Abbau durch Proteinasen ist. Vermutlich erfolgte die Kontaminierung mit Proteinasen durch die den Wurzeln anhaftende Erde, die besonders bei den alten Wurzeln nicht vollständig entfernt werden konnte.

Basierend auf dem Ergebnis des Western Blots wurden für die folgende Immunolokalisation die jungen, weißen Wurzeln der ein- und zweijährigen Pflanze ausgewählt, da das starke Signal eine Markierung auf zellulärer Ebene aussichtsreich erscheinen ließ.

### 3.1.3.1 Untersuchung von Keimlingen durch Western Blot

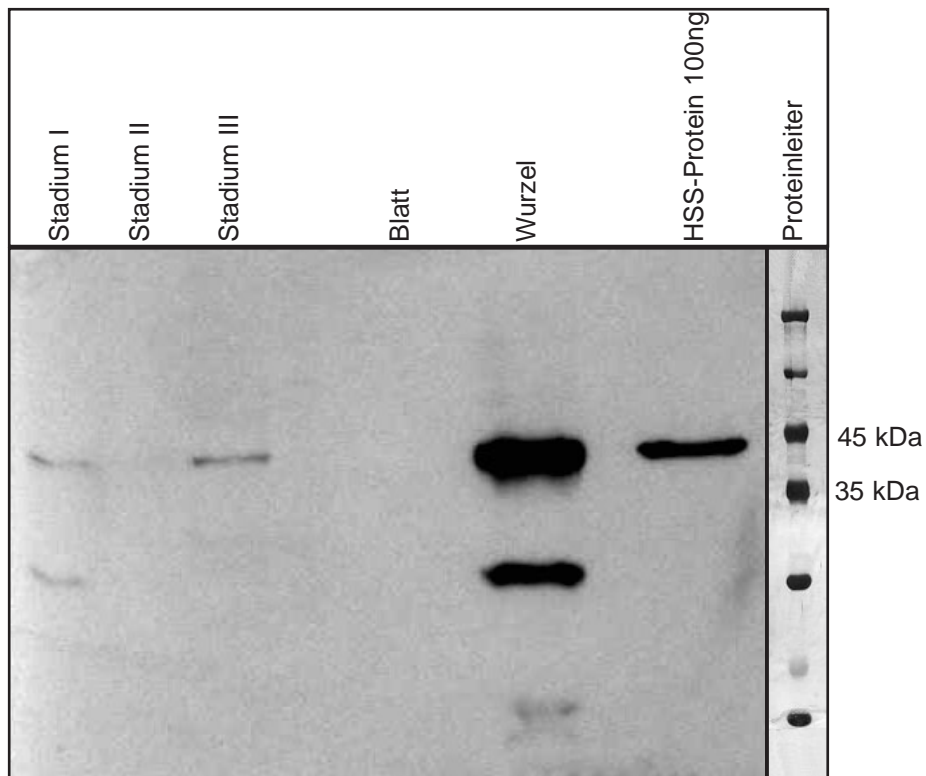
Fütterungsversuche mit radioaktiv markiertem Putrescin am isolierten Sproß von *C. officinale* haben gezeigt, daß dieser zur Synthese von Homospermidin befähigt ist (Van Dam et al., 1995b). Im Western Blot der einzelnen Gewebe (s. Kap. 3.3) konnte jedoch in keinem der untersuchten oberirdischen Organe eine Expression der HSS detektiert werden.

Da die von van Dam durchgeführten Versuche ausschließlich mit Keimlingen und nicht an der voll entwickelten Pflanze durchgeführt worden sind, wurden für die weiteren, gemeinsam mit A. Reimann durchgeführten Untersuchungen ebenfalls Keimlinge eingesetzt. Eine weitere Einschränkung auf den Bereich des Hypokotyls konnte vorgenommen werden, nachdem das gesamte Sproßsystem der Keimlinge kein Signal im Western Blot ergab.

Dazu wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten im Abstand von 2, 4 und 6 Wochen nach Ausbildung der Keimblätter der im Hypokotyl enthaltene Vegetationskegel präpariert und das lösliche Gesamtprotein isoliert (s. Kap. 2.5.3.1). Jeweils 20 µg Protein wurden gefällt (s. Kap. 2.4.1) und wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben im Western Blot untersucht. Als Negativkontrolle wurde ein Blatt und als Positivkontrolle eine Wurzel der Keimlinge in gleicher Weise aufgearbeitet.

Nach der Detektion mit dem ECL-Kit (s. Abb. 3.4) konnte man das HSS-spezifische Signal bei 44 kDa in zwei der drei Proben erkennen. Der Ausfall der zeitlich gesehen mittleren Probe (Stadium II) resultierte aus Problemen bei der Proteinisolierung. Die mit Indian-Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbte PVDF-Membran wies für diese Probe einen signifikant geringeren Proteingehalt aus. Da nicht mehr genügend Pflanzenmaterial zur Verfügung stand, konnte diese Probe leider nicht mehr wiederholt werden. Es kann aber davon ausgegangen werden, daß die HSS in diesem mittleren Stadium ebenfalls exprimiert wird. Der parallel dazu untersuchte Proteinextrakt aus dem Blatt der Keimlinge zeigte kein Signal, womit eine unspezifische Reaktion des Antikörpers unwahrscheinlich ist. In der als Positivkontrolle aufgetragenen Probe der Wurzel konnte hingegen das HSS-spezifische Signal detektiert werden. Zusätzlich traten hier noch die bereits in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Abbaubanden der HSS auf.

Das erhaltene Ergebnis läßt zwei mögliche Schlüsse zu: Zum einen könnte das detektierte Signal der HSS bei 44 kDa auf eine auf den Bereich des Apikalmeristems beschränkte Proteinexpression hindeuten. In diesem Fall könnte die Menge der exprimierten HSS bei der Untersuchung von ganzen Sproßsystemen der Keimlinge auf Grund der starken „Gewebe“-Verdünnung unterhalb der Nachweisgrenze der HSS im Western Blot gelegen haben. Eine andere Möglichkeit für das Auftreten dieser schwachen Signale könnte in der Probenaufbereitung liegen. Die exakte Trennung von der Wurzel und das Präparieren des Hypokotyls wurde ohne optische Hilfsmittel wie z.B. einer Stereolupe durchgeführt. Eine Verunreinigung mit Resten der Wurzel könnte ebenfalls ein positives Signal erzeu-



**Abbildung 3.4:** Western Blot zur Expressionsanalyse der Keimlinge von *C. officinale*. Die Aufarbeitung der Proben und die Detektion erfolgten wie in Abb. 3.3 beschrieben. Der Größenmarker (14,4-116 kDa, Fermentas) wurde nach dem Blotten abgetrennt und mit Indian-Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt. Die **Stadien I-III** entsprechen den jeweiligen Erntezeitpunkten des präparierten Hypokotyls: **Stadium I** 2 Wochen, **Stadium II** 4 Wochen und **Stadium III** 6 Wochen nach Ausbildung des Keimblattes.

gen. Zur genauen Aufklärung müssten von diesem Bereich Längsschnitte angefertigt und die Expression der HSS auf zellulärer Ebene untersucht werden.

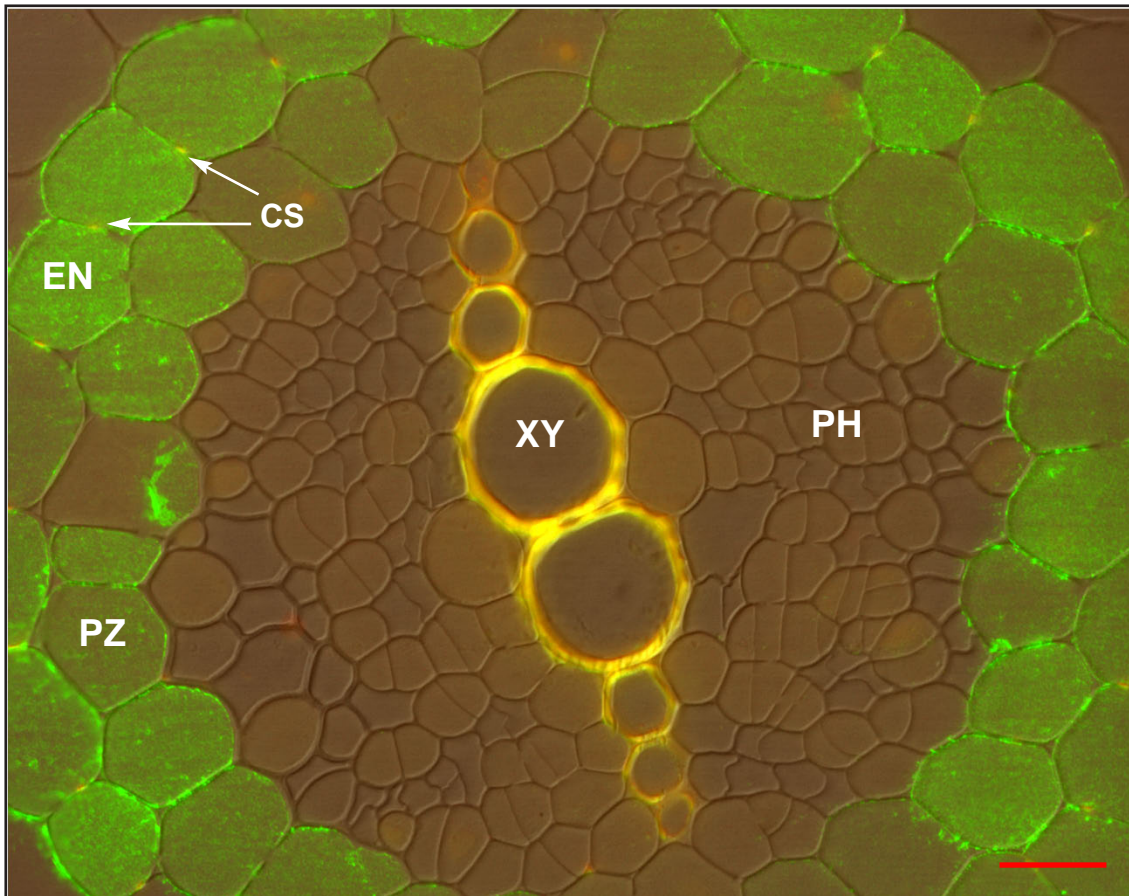
#### **3.1.4 Immunolokalisation der HSS auf zellulärer Ebene in den Wurzeln von *Cynoglossum officinale***

Junge, weiße Wurzeln von der einjährigen und zweijährigen Pflanze wurden in den Kunststoff Technovit 7100 eingebettet (s.Kap. 2.5.5.2). Dabei wurden ausgehend von der Wurzelhaube unterschiedliche ca. 1 cm lange Segmente ausgewählt, um eine mögliche Veränderung der gewebespezifischen Expression im Verlauf der Differenzierung der Wurzel zu untersuchen. Erste Versuche zeigten eine Übereinstimmung zwischen der jungen Wurzel aus der ein- und zweijährigen Pflanze in Bezug auf Lage und Intensität der Markierung, so daß bei folgenden Versuchen zur Immunlokalisation nicht mehr zwischen der ein- und zweijährigen Pflanze unterschieden wurde.

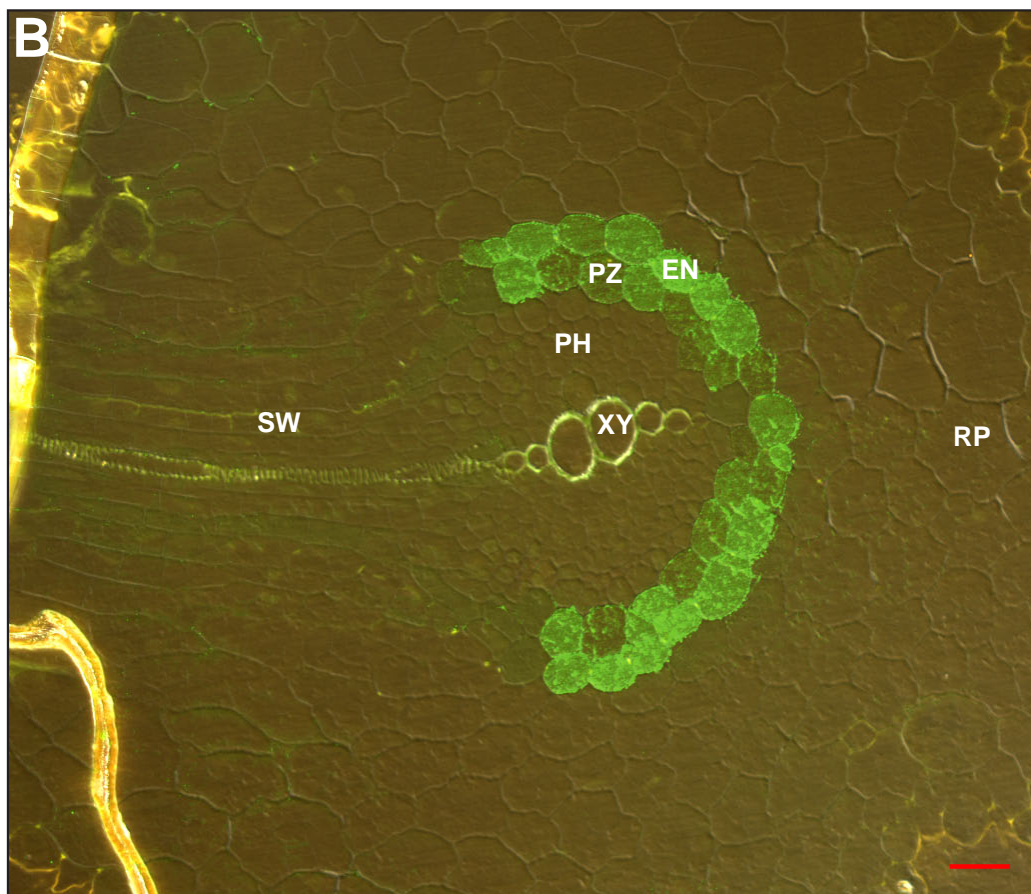
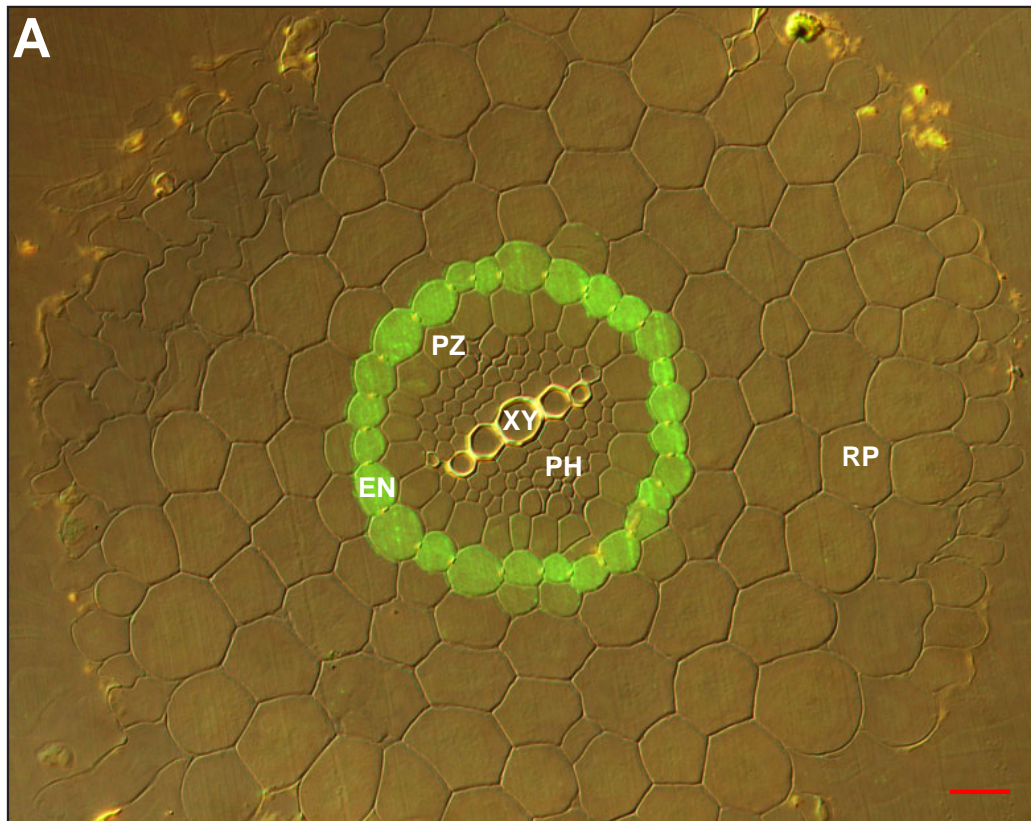
In Abbildung 3.5 ist der Querschnitt einer jungen Wurzel (Schnittdicke 3 µm) nach Inkubation mit dem HSS-Antikörper in einer 1:50 Verdünnung ( $OD_{280}=1,32$ ) und anschließender FITC-Detektion dargestellt. Die diarche Wurzel befindet sich noch im primären Entwicklungszustand. Das zweistrahliges Xylem, sowie der Casparysche Streifen zeigten eine gelbe Autofluoreszenz, die sich jedoch von der grün fluoreszierenden FITC-Markierung deutlich unterschied. Nach der Inkubation zeigten die Zellen der Endodermis und des Perizykels eine starke, durchgängige Markierung. Die Zellen des angrenzenden Rindenparenchyms waren nicht markiert.

Im Verlauf weiterer Immunlokalisationen stellte sich heraus, daß die Markierung der Perizykelzellen nicht immer reproduzierbar auftrat. Die genaue Untersuchung von unterschiedlich differenzierten Wurzelsegmenten ergab eine Abhängigkeit der Expression der HSS im Perizykel von dem Grad der Differenzierung der Wurzel, wohingegen die Zellen der Endodermis unabhängig vom betrachteten Segment immer markiert wurden. Die Abbildung 3.6 zeigt zwei Wurzelquerschnitte aus unterschiedlichen Segmenten der jungen Wurzel von *C.officinale*. Beide Schnitte wurden zunächst mit dem HSS-Antikörper inkubiert und anschließend mit FITC detektiert. Dabei handelte es sich zum einen um ein gerade ausdifferenziertes Segment aus dem Bereich vor der Verzweigungszone mit bereits reifen Xylemstrahlen und einer ausgebildeten Endodermis mit Casparyschem Streifen (Abb. 3.6 A), und zum anderen um ein voll ausdifferenziertes Segment mit bereits austreibenden Lateralwurzeln (Abb. 3.6 B). Es ist deutlich zu erkennen, daß die





**Abbildung 3.5: FITC-markierter Wurzelquerschnitt einer jungen, weißen Wurzel von *C. officinale*.** Man erkennt auf dieser Abbildung eine diarche Wurzel im primären Stadium. Die Schnittdicke betrug 3 µm. Eine FITC-Markierung findet sich in den Zellen der Endodermis und des Perizykels, wobei die Endodermis durch den gelb fluoreszierenden Casparyschen Streifen eindeutig identifiziert werden konnte. Das angrenzende Rindenparenchym ist nicht markiert. Der Xylemstrahl zeigt eine gelbe Autofluoreszenz. **CS**-Casparyscher Streifen, **EN**-Endodermis, **PH**-Phloem, **PZ**-Perizykel, **XY**-Xylem. Der eingezeichnete Größenmarker entspricht einer Länge von 10 µm.



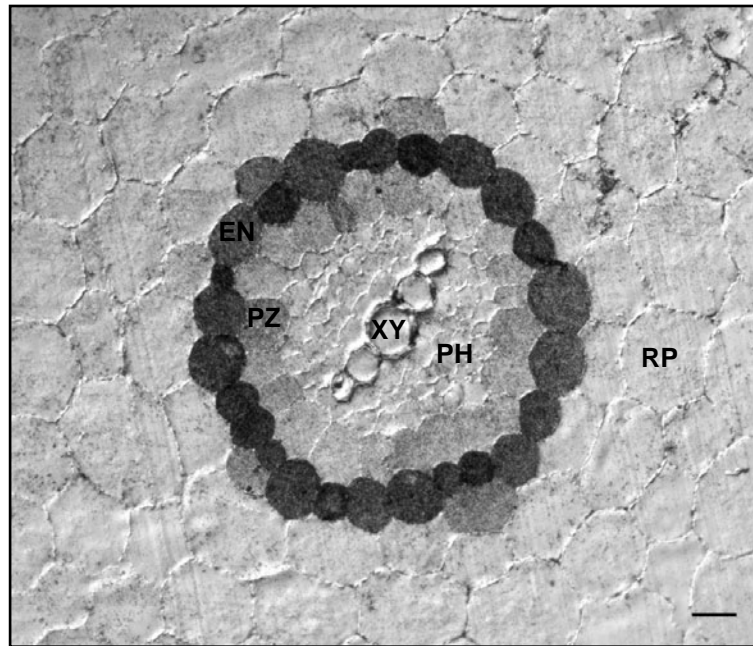
**Abbildung 3.6:** (s.vorherige Seite) FITC Markierung in den jungen, weißen Wurzeln von *C. officinale* in Abhängigkeit vom Grad der Differenzierung. In Abbildung **A** ist eine diarche Wurzel im primären Stadium aus dem Bereich vor der Verzweigungszone zu erkennen. Die FITC-Markierung beschränkt sich hier auf die Zellen der Endodermis, der Perizykel ist nicht markiert. Im Gegensatz dazu ist in Abbildung **B** eine weiter entwickelte Wurzel im Querschnitt gezeigt, aus welcher sich über dem Xylemstrahl eine neue Seitenwurzel ausdifferenziert. Hier erstreckt sich die FITC-Markierung wieder wie in Abb. 3.5 gezeigt über Endodermis und Perizykel. Die Markierung ist im Bereich der neu austreibenden Seitenwurzel unterbrochen. Auf beiden Abbildungen erkennt man die gelbe Autofluoreszenz der Xylemstrahlen, des Casparyschen Streifens sowie der Exodermis. Die Schnittdicke beträgt in beiden Fällen 3 µm. **CS**-Casparyscher Streifen, **EN**-Endodermis, **PH**-Phloem, **PZ**-Perizykel, **SW**-Seitenwurzel, **XY**-Xylem. Der Größenmarker entspricht in beiden Abb. einer Länge von 10 µm.

Expression der HSS im jüngeren Bereich der Wurzel auf die Zellen der Endodermis beschränkt ist, wohingegen mit fortschreitender Ausdifferenzierung die Expression auf die Zellen des Perizykels ausgeweitet wird. Die Expression der HSS wird also offensichtlich für die Zellen der Endodermis und des Perizykels unterschiedlich in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand der Wurzel reguliert.

In Abbildung 3.6 B ist zusätzlich das Ausdifferenzieren einer Seitenwurzel über einem Xylemstrahl zu erkennen. Im Bereich der austreibenden Seitenwurzel war die Markierung von Endodermis und Perizykel unterbrochen. Auch die neu entstehende Seitenwurzel ist frei von einer FITC-Markierung. Ein ähnliche Beobachtung wurde bei *E. cannabinum* gemacht, wo die Markierung des Rindenparenchyms ebenfalls im Bereich einer austretenden Seitenwurzel unterbrochen war (Anke, 2004).

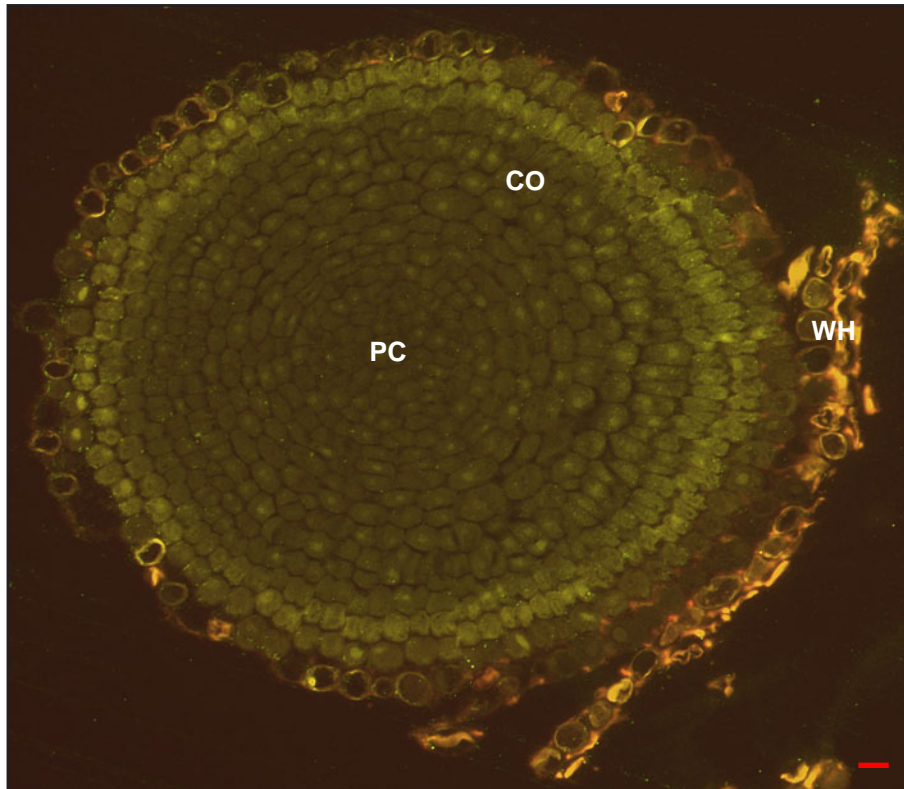
Für die Detektion mit Immunogold (s.Kap. 2.5.5.6) wurden Schnitte der gleichen Proben wie für die FITC-Markierung eingesetzt. Zur Signalverstärkung wurden die Proben anschließend mit dem Silver-Enhancement-Kit inkubiert. Der Vorteil dieser Methode lag in der höheren Empfindlichkeit, die jedoch unter Umständen auch mit einem erhöhten Hintergrundsignal einherging. So galt es empirisch die Inkubationszeit mit dem Silberreagenz zu ermitteln, um ein optimales Signal/Rausch-Verhältnis zu erzielen. Bei Temperaturen um 18-20 °C lag die Inkubationszeit bei ca. 12 min. Bei höheren Umgebungstemperaturen als 25 °C konnte diese Art der Detektion nicht mehr angewendet werden, da es zu unspezifischen Silberablagerungen kam.

In Abbildung 3.7 erkennt man den Wurzelquerschnitt (Schnittdicke 3 µm) durch eine

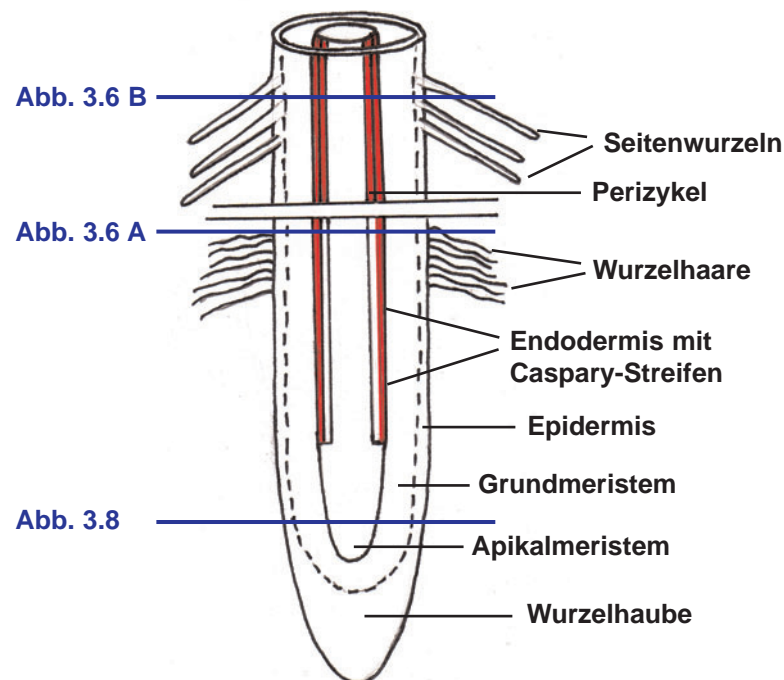


**Abbildung 3.7:** Immunogold-Markierung einer jungen Wurzel von *C. officinale*. Die Abbildung zeigt den 3 μm dicken Querschnitt durch eine junge Wurzel von *Cynoglossum officinale*. Nach der Inkubation mit dem HSS-Antikörper in einer 1:100 Verdünnung ( $OD_{280}=1,32$ ) erfolgte die Detektion mit dem Gold-konjugiertem sekundären Antikörper in einer 1:50 Verdünnung und anschließender Verstärkung des Signals mit Silver-Enhancement (s. Kap. 2.5.5.6). Die Auswertung erfolgte im Hellfeld. Zu erkennen ist eine starke Markierung der Endodermis. Die Zellen des Perizykels zeigen ein schwaches, beginnendes Signal. **EN**-Endodermis, **PH**-Phloem, **PZ**-Perizykel, **XY**-Xylem. Der eingezeichnete Größenmarker entspricht einer Länge von 10 μm.





**Abbildung 3.8:** FITC-Markierung einer jungen Wurzel von *C. officinale* im Bereich der Zellteilungszone. Nach der Inkubation mit dem HSS-Antikörper und anschließender Detektion mit FITC (s. Kap.2.5.5.5) konnte keine HSS in den noch nicht ausdifferenzierten Zellen nachgewiesen werden. Die abschilfernden Reste der Wurzelhaube zeigten bei der Anregungswellenlänge von 495 nm eine gelbe Autofluoreszenz. **CO**-Cortex, **PC**-Procambium, **WH**-Zellen der Wurzelhaube. Der eingezeichnete Balken entspricht einer Länge von 10 µm.



**Abbildung 3.9: Expressionsmuster der HSS in der jungen Wurzel von *C. officinale*.** Während im undifferenzierten Bereich im Anschluß an die Wurzelhaube noch keine HSS detektierbar ist, nimmt die Expression über die gerade ausdifferenzierte Wurzel mit einer markierten Endodermis bis hin zur Wurzel in der Verzweigungszone mit Wurzelhaaren und austretenden Seitenwurzeln, wo die Markierung Endodermis und Perizykel umfaßt, zu. Dabei scheint der Übergang fließend zu sein. Blau eingezeichnet sind die Schnittebenen der Wurzelquerschnitte.

junge Wurzel von *C. officinale* nach der Detektion mit Immunogold. Die mikroskopische Auswertung erfolgte im Hellfeld unter Verwendung des DIC-Filters, um die räumliche Struktur der Zellen besser erkennen zu können. Nach der Verstärkung mit Silber waren die Zellen der Endodermis durchgängig sehr stark markiert. Das angrenzende Rindenparenchym zeigte auch hier wie bereits bei der Detektion mit FITC keine Markierung. Die Zellen des Perizykels zeigten ein sehr schwaches Signal, was auf eine beginnende Expression schließen läßt. Die Wurzel in Abb. 3.7 zeigt somit wahrscheinlich einen Übergangszustand von der Markierung der Endodermis im jungen Stadium (vgl. Abb. 3.6 A) bis hin zur Markierung von Endodermis und Perizykel im voll ausdifferenzierten Stadium (vgl. Abb. 3.5 und 3.6 B).

Im noch undifferenzierten Bereich der Zellteilungszone im Anschluß an die Wurzelhaube (s. Abb. 3.8) konnte keine Markierung mit dem spezifischen HSS-Antikörper nachgewiesen werden. Die Zellen wiesen in diesem Bereich noch keine erkennbare Differenzierung in Leitgewebe und Rindenparenchym auf. Reste der abschilfernden Wurzelhaube zeigten unter der eingesetzten Anregungswellenlänge von 495 nm nur eine gelbe Autofluoreszenz. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Expression der HSS in der Wurzel von *C. officinale* streng auf das jeweilige Entwicklungsstadium abgestimmt ist. Während im undifferenzierten Bereich im Anschluß an die Kalyptra noch keine HSS detektierbar ist, nimmt die Expression über die gerade ausdifferenzierte Wurzel mit einer markierten Endodermis bis hin zur Wurzel in der Verzweigungszone mit Wurzelhaaren und austretenden Seitenwurzeln, wo die Markierung Endodermis und Perizykel umfaßt, zu (Abb. 3.9).

#### 3.1.4.1 Kontrollversuche zur Spezifität der Markierung

Um zu überprüfen, ob der affinitätsgereinigte HSS-Antikörper die HSS auch wirklich spezifisch im Gewebe detektiert, wurden verschiedene Kontrollversuche durchgeführt. Durch Inkubation mit 1xPBS an Stelle des spezifischen Antikörpers wurde überprüft, ob die sekundären Antikörper eine unspezifische Markierung im Gewebe zeigen. Da nach der Detektion in keinem Fall eine Immunantwort auftrat, konnte diese Möglichkeit ausgeschlossen werden.

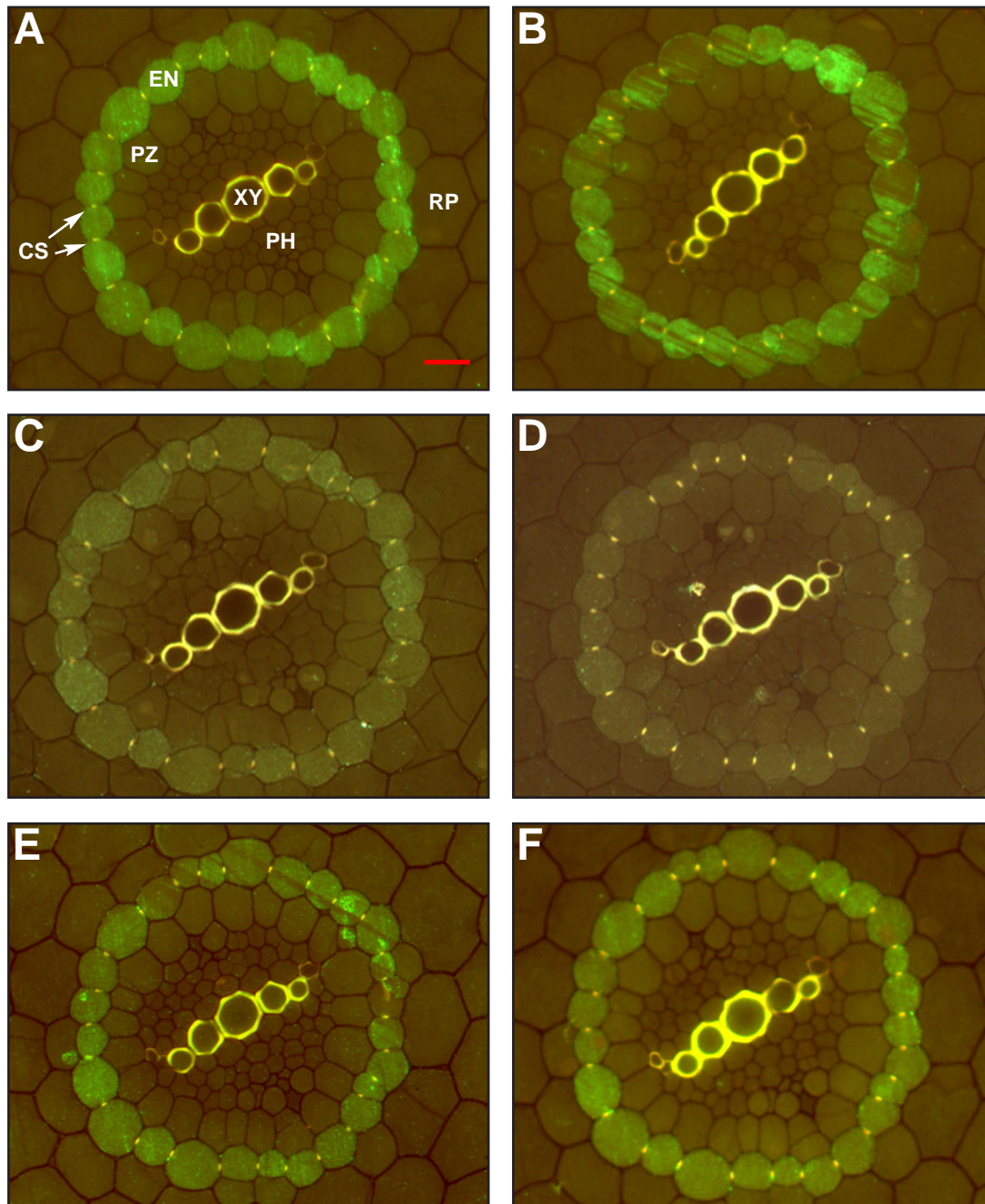
Auf eine Inkubation mit dem Präimmunserum mit anschließendem Vergleich zur Inkubation mit „Final“-Bleeding wurde verzichtet, da in früheren Arbeiten mit *Senecio vernalis* gezeigt wurde, daß dadurch keinerlei zusätzliche Aussagen über die Spezifität des Antikörpers möglich waren (Moll, 2002).

Die im Western Blot aufgezeigte Kreuzreaktivität des Antikörpers mit der DHS (vgl. Abb. 3.2) konnte auch bei der Lokalisation im Gewebe nicht ausgeschlossen werden. Um falsch positive Signale zu verhindern, wurden jeweils 2 Unterfütterungen des Antikörpers mit dem aufgereinigten rekombinanten HSS-Protein und dem entsprechenden DHS-Protein aus der gleichen Pflanze durchgeführt. Dazu wurde der Antikörper zum einen mit einem Zehntel seiner Konzentration und zum anderen mit einem dreifachen Überschuß des jeweiligen Proteins gegenüber der IgG-Konzentration für 30 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurde kurz abzentrifugiert und der Überstand auf den Schnitt pipettiert. Die weitere Inkubation und Detektion erfolgte wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben. In

gleicher Weise wurde der Antikörper mit einem dreifachen Überschuß an BSA-Protein inkubiert, um unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers zu Fremdproteinen zu überprüfen.

Im Falle einer spezifischen Markierung dürfte die Intensität nach einer Unterfütterung mit dem DHS-Protein und dem BSA-Protein nicht schwächer werden. Die Unterfütterung mit dem HSS-Protein hingegen müßte in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration eine Abschwächung beziehungsweise Auslöschung der Markierung bewirken. Abbildung 3.10 C zeigt, daß bereits bei Unterfütterung mit HSS-Protein, dessen Konzentration 1/10 der spezifischen Antikörper-Konzentration entsprach, die Markierung im Vergleich zur Inkubation mit dem Antikörper ohne Vorinkubation (Abb. 3.10 A) sichtlich an Intensität verloren hat. Bei einem dreifachen Überschuß von HSS-Protein (Abb. 3.10 D) trat keine Markierung der Zellen der Endodermis mehr auf. Im Gegensatz dazu hatte die Vorinkubation mit den beiden entsprechenden Konzentrationen von DHS-Protein (Abb. 3.10 E und F) keinen Einfluß auf die Intensität der Markierung. Somit konnte ein Einfluß der DHS auf die Spezifität der Markierung eindeutig ausgeschlossen werden. Eine Markierung von Fremdprotein konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da die Inkubation mit dem dreifachen Überschuß BSA-Protein (Abb. 3.10 B) im Vergleich zur IgG-Konzentration keinen Einfluß auf die Markierung hatte.





**Abbildung 3.10:** Ausschnitte von FITC-markierten Wurzelquerschnitten (Schnitt-  
dicke 3 µm) von *C.officinale* aus den Kontrollversuchen zur Spezifität der Mar-  
kierung. Die Vorinkubierung des Antikörpers und die anschließende Detektion erfolgten wie  
in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben. **CS**-Casparyscher Streifen, **EN**-Endodermis, **PH**-Phloem, **PZ**-  
Perizykel, **XY**-Xylem.

Detektiert wurde nach Inkubation mit dem HSS-Antikörper ohne Unterfütterung (**A**) sowie  
nach Vorinkubation mit jeweils einem Zehntel bzw. einem dreifachen Überschuß an HSS- (**C**  
+ **D**) und DHS- (**E**+**F**) Protein. Zusätzlich wurde mit einem dreifachen Überschuß an BSA-  
Protein (**B**) unterfüttert. Der eingezeichnete Größenmarker entspricht einer Länge von 10 µm.

## 3.2 Gewebespezifische Expression der HSS in *Symphytum officinale*

In der Vergangenheit durchgeführte biochemische Untersuchungen haben eine Biosynthese der PAs in der Wurzel von *Symphytum officinale* ergeben (Frölich, 1996). Da sowohl in isolierten Sproßkulturen ohne Wurzel als auch in Kalluskulturen keine PAs nachgewiesen werden konnten, scheint die PA-Biosynthese in *S. officinale* auf die Wurzel beschränkt zu sein. (Babucke, unveröffentlicht, Huizing 1983).

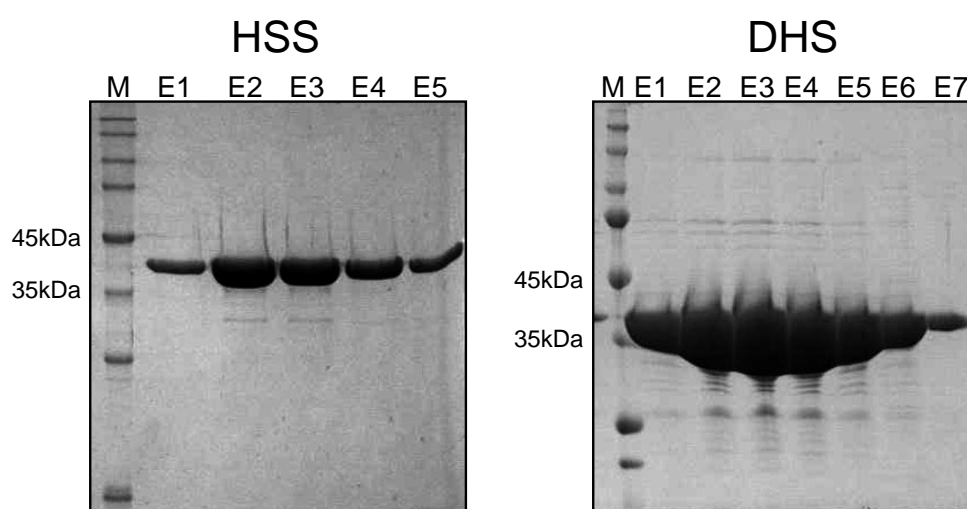
Parallel zu diesen Arbeiten durchgeführte Versuche in unserer Arbeitsgruppe an der mehrjährigen Staude *S. officinale* haben gezeigt, daß das *hss*-Gen in den Wurzeln transkribiert wird, was die früheren Untersuchungen bestätigt. Darüber hinaus konnte durch RT-PCR das *hss*-Gen in den jungen und alten Blättern, in der Knospe und in den Blüten nachgewiesen werden (Reimann, 2007). Die Auswahl der Gewebe für die folgenden Expressionsanalysen orientierte sich an der von Reimann durchgeführten RT-PCR, um die Transkription der HSS mit der Proteinexpression in den verschiedenen Geweben vergleichen zu können. Ein Vergleich der gewebespezifischen Lokalisation mit *C. officinale* sollte ferner zeigen, ob sich der monophyletische Ursprung der HSS innerhalb der Boraginaceen auf Ebene der gewebespezifischen Expression widerspiegelt.

### 3.2.1 Reinigung der rekombinanten HSS und DHS aus *Symphytum officinale*

Für die Herstellung des spezifischen HSS Antikörper sowie für die weiteren Spezifitätsuntersuchungen wurde aufgereinigte HSS benötigt. Das Konstrukt der HSS cDNA mit einem 6x His-Tag stand mir zu Beginn dieser Arbeit bereits in Form von Dauerkulturen zur Verfügung und konnte wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben heterolog im *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) erfolgreich exprimiert werden. Die Herstellung des Konstrukts erfolgte durch Ligation in den linearisierten Vektor pET3a nach Restriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Nde*I (Reimann, 2007). Die anschließende Aufreinigung mit Hilfe der Ni-NTA-Agarose ergab zunächst kein befriedigendes Ergebnis, da das Zielprotein nicht an die Gelmatrix koppelte und mehrfach quantitativ im Durchlauf zu finden war. In weiteren Versuchen wurden die Bedingungen während des Koppelns nach Vorschrift des Herstellers Qiagen (Kapitel „Troubleshooting“) modifiziert, was aber zu keiner Verbesserung des Ergebnis führte. Erst durch den Einsatz von Talon<sup>®</sup> als Säulenmaterial konnte die HSS wie in Kapitel 2.4.4.2 beschrieben in einem Schritt metallaffinitätschromatographisch aufgereinigt werden (Abb. 3.11).

Um die Spezifität der im weiteren Verlauf durchgeführten Immunolokalisationen zu über-

prüfen, wurde zusätzlich reines DHS-Protein benötigt. Da die bereits in unserer Arbeitsgruppe vorliegende klonierte DHS aus *S. officinale* nicht über den für die metallaffinitätschromatographische Aufreinigung benötigten His-Tag verfügte, wurden mit Hilfe der PCR an die bereits bekannte Sequenz 6 Histidin-Reste an den C-Terminus angehängt. Die PCR mit den spezifischen Primern (s. Tab. 2.1) sowie alle weiteren folgenden Schritte wurden analog wie für *C. officinale* in Kapitel 3.1.1 beschrieben durchgeführt. Abschließend konnte die DHS mit Hilfe der Ni-NTA in einem Schritt aufgereinigt werden (Abb. 3.11).



**Abbildung 3.11: Aufreinigung der rekombinanten HSS und DHS aus *S. officinale*.** Gezeigt werden die Coomassie-gefärbten SDS-Gele (s. Kap. 2.4.3.1) nach der metallaffinitätschromatographischen Aufreinigung. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der Elutionsfraktionen (E1-E7). M= 14,4-116 kDa Proteinleiter (Fermentas)

### 3.2.2 Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die DHS im Western Blot

Da auch bei *S. officinale* nicht ausgeschlossen werden konnte, daß es zu einer Kreuzreaktivität des spezifischen HSS-Antikörpers mit der DHS kommt, wurde diese mögliche Kreuzreaktivität, wie im Kapitel 3.1.2 für *C. officinale* beschrieben, im Western Blot überprüft. Die Identität auf Aminosäureebene zwischen HSS und DHS lag hier mit 74 % auf einem ähnlich hohen Niveau wie bei *C. officinale*.

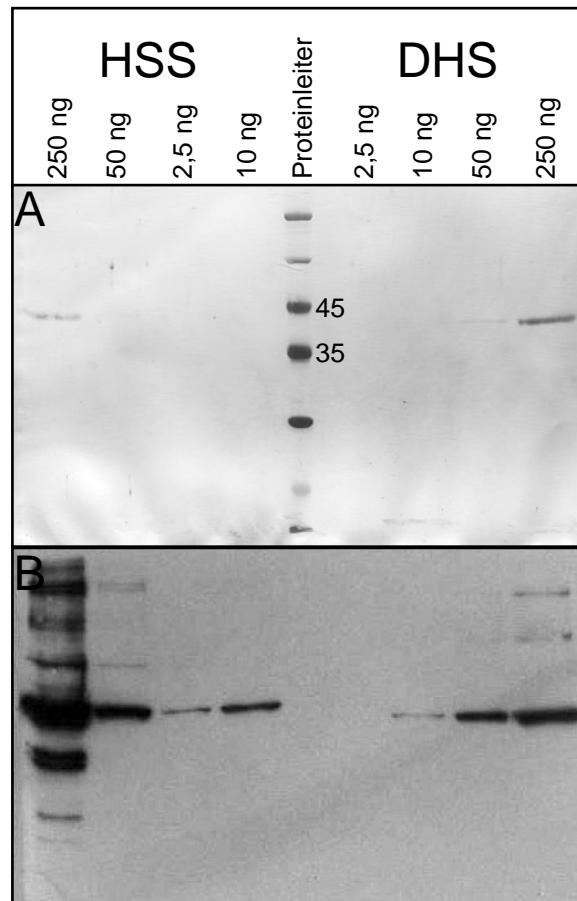
Auf der mit dem spezifischen HSS-Antikörper detektierten Membran (Abb. 3.12 B) ist zu erkennen, daß die HSS bis zu einer Konzentration von 2,5 ng erkannt wurde. Die DHS konnte unter gleichen Bedingungen nur bis zu einer Konzentration von 10 ng detektiert werden, wobei das Signal der HSS bei 2,5 ng hinsichtlich der Intensität sogar stärker erscheint als das Signal der DHS bei 10 ng. Somit detektierte der spezifische HSS-Antikörper unter der Voraussetzung, daß gleiche Konzentrationen eingesetzt werden, die HSS um den Faktor 4 empfindlicher als die DHS, was in Bezug auf die gewebespezifische Lokalisation (s. Kap. 3.2.4) weitere Spezifitätsuntersuchungen notwendig machte.

### 3.2.3 Expressionsanalyse durch Western Blot

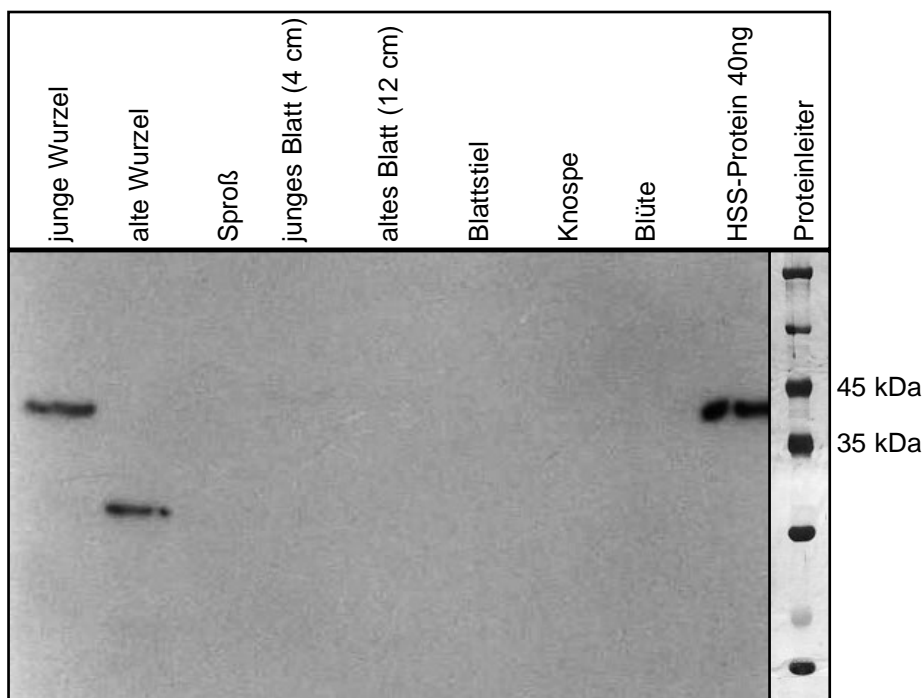
Um die Gewebe für die Immunolokalisation auszuwählen, wurde die Expression der HSS in verschiedenen Organen von *S. officinale* im Western Blot untersucht. Die Auswahl der Gewebe erfolgte analog der von Reimann im Vorfeld durchgeführten RT-PCR, um die Ergebnisse anschließend miteinander vergleichen zu können.

Das HSS-spezifische Signal bei 44 kDa konnte nur in der jungen, weißen, jährlich neu austreibenden Wurzel detektiert werden (Abb. 3.13). In der Spur der alten Wurzel trat nur eine Bande bei ungefähr 26 kDa auf. Hierbei handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um das bereits bei *C. officinale* (s. Kap. 3.1.3) beobachtete Abbauprodukt der HSS. Über das Fehlen der passenden zweiten Abbaubande bei 18 kDa kann nur spekuliert werden, zumal auch in anderen Versuchen nicht immer alle Abbaubanden gleichzeitig aufgetreten sind. In allen untersuchten oberirdischen Organen konnte die HSS nicht detektiert werden. Damit konnten die Ergebnisse der RT-PCR, die neben der Wurzel auch eine Transkription der HSS in den Blättern, der Knospe und der Blüte aufgezeigt haben (Reimann, 2007), auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Die Proben für die RT-PCR und für den Western Blot wurden von unterschiedlichen Pflanzen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt. Dieser Umstand könnte eine Ursache für die unterschiedlichen Signale sein, da bereits von *E. cannabinum* bekannt ist, daß die Expression der HSS in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium unterschiedlich reguliert werden kann (Anke et al., 2004). Wäre dies auch für *S. officinale* der Fall, könnte eine zu einem späteren Zeitpunkt genommene Probe bereits ein anderes Expressionsmuster aufweisen als die zuvor gesammelte Probencharge.

Da die jungen Blätter ein sehr starkes Signal in der RT-PCR gezeigt haben (Reimann,



**Abbildung 3.12:** Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die HSS und DHS aus *S. officinale* im Western Blot. Jeweils gleiche Mengen von HSS und DHS wurden im SDS-Gel (s. Kap. 2.4.2) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. Kap. 2.5.3). Die PVDF-Membran wurde nach Kap. 2.5.3.3 nacheinander mit dem spezifischen HSS Antikörper ( $OD_{280}=1,31$ ) in einer 1:10000 Verdünnung und dem sekundären Antikörper (1:3300) inkubiert und anschließend mit dem ECL-Kit detektiert (**B**). Im Anschluß daran wurde die Membran mit Indian-Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt (**A**). Zur Identifizierung der Banden wurde zusätzlich ein 14,4-116 kDa Proteinmarker (Fermentas) aufgetragen.



**Abbildung 3.13: Western Blot verschiedener Gewebe von *S. officinale*.** Jeweils 20 µg isoliertes Gesamtprotein aus den Geweben wurde im SDS-Gel (s. Kap. 2.4.2) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. Kap. 2.5.3). Im Anschluß an die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:10000, OD<sub>280</sub>=1,31) und dem sekundären Antikörper (1:3300) erfolgte die Detektion mit dem ECL-Kit (s. Kap. 2.5.3.3). Der 14,4-116 kDa Größenmarker (Fermentas) wurde nach dem Blotten von der Membran abgetrennt und mit Indian Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt, um die Größe der Banden abschätzen zu können.

2007), wurden noch einmal die jungen Blätter auf Expression der HSS untersucht (s. Kap. 3.2.3.1).

### 3.2.3.1 Expressionsanalyse der HSS im jungen Blatt

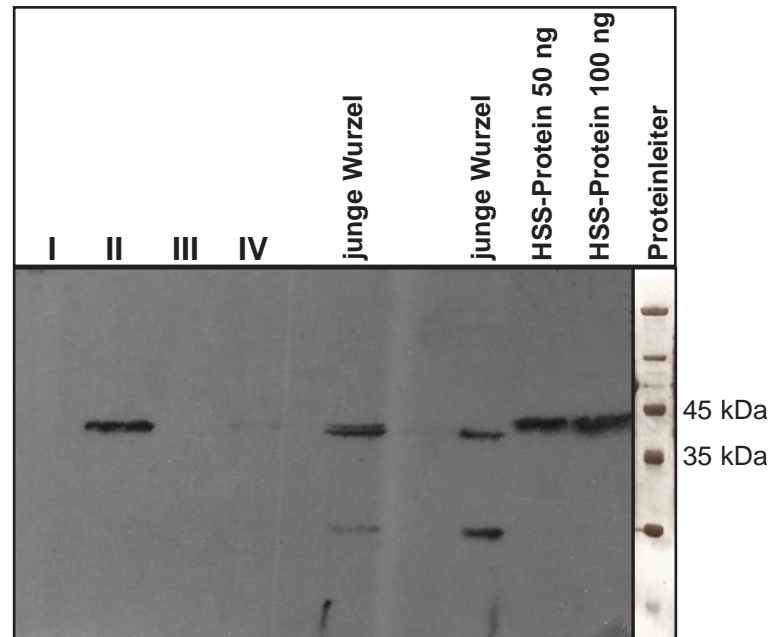
Das Ergebnis des Western Blots (s. Kap. 3.2.3) bestätigte zwar die vorliegenden Daten aus früheren biochemischen Untersuchungen, wonach die Wurzel das exklusive Organ der Homospemidinbiosynthese ist (Fröhlich, 1996). Es ergaben sich aber Widersprüche zu den parallel durchgeführten RT-PCR-Experimenten, die Hinweise auf eine mögliche Expression in den Blättern von *S. officinale* ergaben (Reimann, 2007). Diese interessante und zuvor noch nicht beschriebene Ausweitung der Expression auf den oberirdischen

Bereich sollte nun in einem Western Blot bestätigt werden. Theoretisch denkbar wäre zum Beispiel eine kurzzeitige, zusätzliche PA-Biosynthese im jungen Blatt abhängig vom Stand der Entwicklung, um es im empfindlichen ersten Stadium besser vor Fraßfeinden zu schützen. Zu dieser zeitlichen Begrenzung könnte noch eine lokale Beschränkung der Expression auf einige wenige Zellschichten hinzukommen, was die gewebespezifische Immunlokalisation noch einmal erschweren würde. Unter diesen Voraussetzungen erschien es am günstigsten, zunächst die ganz jungen Blätter von *S. officinale* einer genaueren Untersuchung zu unterziehen, da sich bei ihnen der Verdünnungseffekt im Fall einer lokal begrenzt vorkommenden HSS durch weitere Gewebe der Probe noch nicht so stark bemerkbar macht wie beispielsweise in einem älteren und damit größeren Blatt.

Interessanterweise zeigte sich im Western Blot (Abb. 3.14), daß die HSS nur in den jungen Blättern expremiert wird, die am Ende eines Seitentriebes stehen, der ausschließlich Knospen trägt (Spur II + IV). Das Signal in Spur IV ist schwächer, da es sich bei dieser Probe um eine ältere Aufarbeitung handelt, die noch einmal zur Bestätigung eingesetzt wurde. Die gleichen endständigen Blätter eines anderen Triebes, der jedoch bereits voll erblühte Blüten trägt, ergaben kein Signal (Spur I). Ebenso konnte in den endständigen Blättern von blütenlosen Trieben keine HSS nachgewiesen werden (Spur III). In einem zuvor durchgeführten Western Blot aller Gewebe (s. Abb. 3.13) konnte bereits gezeigt werden, daß die übrigen jungen und alten Blätter keine Proteinexpression der HSS zeigen.

Dieses zeitlich auf das Knospenstadium beschränkte Vorkommen der HSS in den endständigen jungen Blättern der Seitentriebe könnte der Pflanze dazu dienen, den für das Fortbestehen essentiellen Fortpflanzungsapparat zusätzlich zu schützen. Mit dem Öffnen der Blüten würde diese zusätzliche PA-Produktion wieder abgeschaltet werden. Die bereits in früheren Arbeiten beschriebene Akkumulation der PAs in den Blüten erfolgt dann wieder ausschließlich über die Wurzel als Ort der Biosynthese. Die nun vorliegenden Daten bestätigen somit zum einen die bisherigen Erkenntnisse, wonach die PA-Biosynthese in den Wurzeln abläuft und erweitern sie darüber hinaus um die Lokalisation der HSS in den jungen Blättern von *S. officinale*. Hier zeigen sich Parallelen zu *E. cannabinum*, wo die Expression der HSS ebenfalls im Knospenstadium ihr Maximum erreicht, um dann mit dem Öffnen der Blüten abzunehmen und nach Ausbildung der Frucht ganz abgeschaltet zu werden (Anke et al., 2004)

Besonders interessant erschien dann im weiteren Verlauf die genaue gewebespezifische Lokalisation der HSS in den jungen Blättern, da die HSS erstmalig in den Blättern



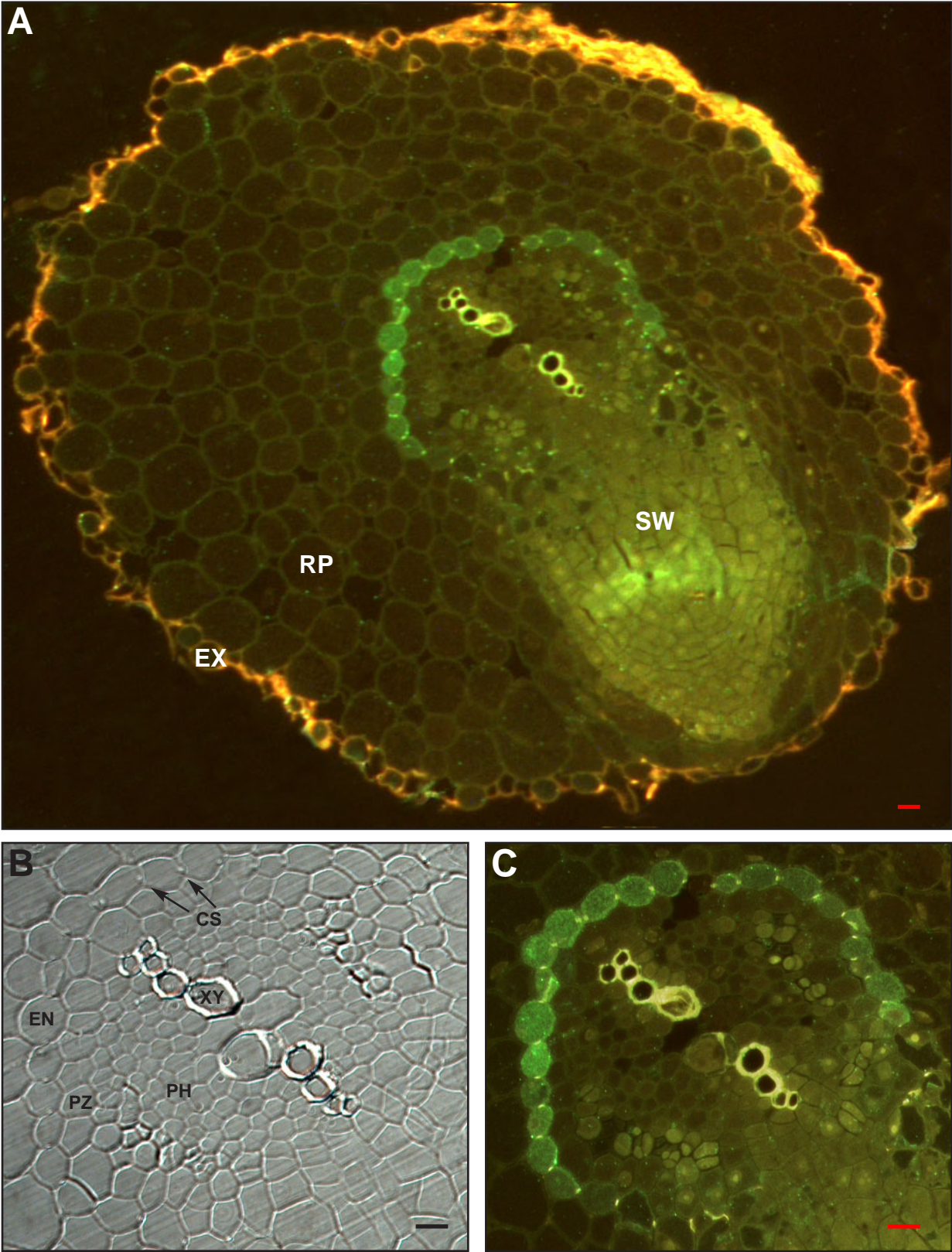
**Abbildung 3.14: Western Blot zur Untersuchung der HSS-Expression in den jungen Blättern von *S. officinale*.** Die Durchführung des Western Blot sowie die Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper erfolgten wie in Abb. 3.13 beschrieben. **I:** Junges, endständiges Blatt von Seitentrieb mit Blüten; **II + IV:** Junges, endständiges Blatt von Seitentrieb mit ausschließlich Knospen; **III:** Junges, endständiges Blatt von Seitentrieb ohne Blütenanlage. Der 14,4-116 kDa Größenmarker (Fermentas) wurde nach dem Blotten von der Membran abgetrennt und mit Indian Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt, um die Größe der Banden abschätzen zu können.

von *S. officinale* nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden die entsprechenden Blätter in Technovit 7100 eingebettet (s. Kap. 2.5.5.2) und für erste Markierungsversuche eingesetzt (s. Kap. 3.2.5).

### 3.2.4 Immunolokalisation der HSS auf zellulärer Ebene in den Wurzeln von *Symphytum officinale*

Basierend auf den Daten des Immunoblots der verschiedenen Gewebe (s. Abb. 3.13) wurden zunächst junge, weiße, jährlich neu austreibende Wurzeln in den Kunststoff Technovit 7100 eingebettet (s. Kap. 2.5.5.2) und wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Um das Einbetten effektiver zu gestalten, wurden die ausgewählten Wurzeln parallel wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben mit Hilfe des neu





**Abbildung 3.15:** (s. vorherige Seite) **AlexaFluor®488-markierter Wurzelquerschnitt von *S. officinale* in der Übersicht und im Detail.** Der 3 µm dicke Querschnitt wurde zunächst nacheinander mit dem spezifischen HSS-Antikörper (OD<sub>280</sub>=1,31) in einer 1:100 Verdünnung und dem sekundären AlexaFluor®488-Antikörper in einer 1:100 Verdünnung inkubiert. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben. In Bild **A** erkennt man das diarche Leitbündel der Wurzel. Über dem Xylemstrahl differenziert sich eine neue Seitenwurzel aus. Die Markierung befindet sich in den Zellen der Endodermis mit Ausnahme der Zellen im Bereich der neu entstehenden Seitenwurzel. Die Exodermis der Wurzel, sowie die Xylemstrahlen und der Caspary-Streifen zeigen eine gelbe Autofluoreszenz. Die Abbildungen **B** und **C** zeigen eine Detailaufnahme von **A** im Hellfeld (**B**) und unter Fluoreszenzlicht (**C**). In der Detailaufnahme erkennt man deutlich die Autofluoreszenz des Caspary-Streifen innerhalb der markierten Endodermis. **CS**-Casparyscher Streifen, **EN**-Endodermis, **PH**-Phloem, **PZ**-Perizykel, **RP**-Rindenparenchym, **SW**-Seitenwurzel, **XY**-Xylem. Der eingefügte Größenbalken entspricht 10 µm.

etablierten Dotblot auf eine HSS-Expression untersucht. So konnten bereits im Vorfeld der aufwendigen Prozedur des Einbettens negative Proben aussortiert werden, wodurch Zeit und Material gespart wurde.

In Abb. 3.15 A ist der Wurzelquerschnitt durch die junge Wurzel von *S. officinale* mit einem diarchen Leitbündel zu erkennen. Über dem Xylemstrahl bildet sich gerade eine Seitenwurzel aus, die aus dem Perizykelgewebe hervorgeht.

Nach Inkubation mit dem spezifischen HSS-Antikörper und der Detektion mit dem sekundären AlexaFluor®488 konjugierten Antikörper wurden ausschließlich die Zellen der Endodermis markiert. Die Zellen des Perizykels und des Rindenparenchyms zeigten keine Markierung. Eine von der Entwicklung der Wurzel abhängige Ausweitung der HSS-Expression auf den sich an die Endodermis anschließenden Perizykel wie bei *C. officinale* (s. Kap. 3.1.4) wurde nicht beobachtet. Hier zeigten sich bereits erste Unterschiede in der Regulation der gewebespezifischen Expression der HSS innerhalb der Boraginaceen. Obwohl die HSS sowohl bei *C. officinale* als auch bei *S. officinale* in der Wurzel lokalisiert ist, offenbaren sich bei genauerer Betrachtung feine Unterschiede auf zellulärer Ebene, was deutlich macht, daß die Expression der HSS auch in Anbetracht des monophyletischen Ursprungs innerhalb der Familie der Boraginaceae individuell reguliert wird.

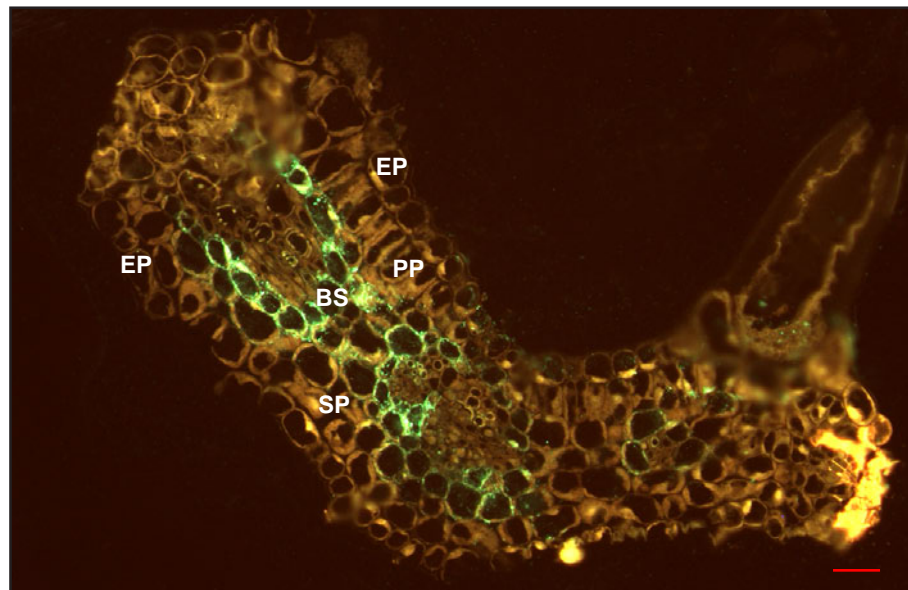
In dem Bereich der neu entstehenden Seitenwurzel war die Markierung der Endodermis unterbrochen. Diese interessante Beobachtung wurde schon bei *C. officinale* (s. Abb.

3.6) beschrieben und zeigt, wie flexibel und spezifisch die Expression der HSS reguliert wird. Mit dem Entstehen der Seitenwurzel ist ein Funktionswechsel der daran beteiligten Zellen und ein daraus resultierender Verlust der HSS-Produktion verbunden. Diese Beobachtung wurde bereits in der Vergangenheit für andere Pflanzenfamilien beschrieben (Anke et al., 2004).

Die Exodermis zeigt wie das Xylem und der Casparysche Streifen der Endodermis eine gelbe Autofluoreszenz bei der Anregungswellenlänge von 495 nm. In der Detailansicht (Abb. 3.15 C) ist deutlich die ausschließliche Markierung der Endodermis zu erkennen, der Perizykel sowie die direkt angrenzenden Zellen des Rindenparenchyms zeigten keine Immunantwort.

### **3.2.5 Immunolokalisation der HSS auf zellulärer Ebene im jungen Blatt von *Symphytum officinale***

Im Western Blot (s. Kap. 3.2.3.1) zeigten die jungen, endständigen Blätter eines Seitentriebes mit ausschließlich Knospen ein schwaches Signal bei 44 kDa. Da die Arbeit zu diesem Zeitpunkt bereits sehr weit fortgeschritten war, konnte mit der gewebespezifischen Lokalisation nur noch begonnen werden. Abb. 3.16 zeigt den Querschnitt durch ein junges Blatt. Deutlich zu erkennen sind die obere und untere Epidermis, das Palisaden- sowie das Schwammparenchym. Bei der Detektion mit AlexaFluor® 488 nach der Inkubation mit dem spezifischen HSS-Antikörper wurden die Zellen der Bündelscheide markiert. Die Bündelscheide umhüllt das Leitgewebe und kontrolliert den Ein- und Ausstrom von Substanzen in das Leitgewebe. Damit nimmt die Bündelscheide eine der Wurzelendodermis analoge Funktion ein. Vor diesem Hintergrund erscheint eine Markierung dieser Zellen besonders interessant, da mit der Markierung der Endodermis in der Wurzel das anatomische Gegenstück als Expressionsort der HSS identifiziert wurde. Hier könnte noch in weiteren, künftigen Versuchen eine mögliche Abhängigkeit der Expression von der Entwicklung des Blattes untersucht werden. Ebenso könnte die subzelluläre Lokalisation mit Hilfe der Elektronenmikroskopie zeigen, ob die HSS in den Zellen der Bündelscheide ebenfalls cytosolisch lokalisiert ist wie für die in *S. vernalis* beschriebene Markierung der Endodermis (Moll et al., 2002). Zudem müßte die Spezifität der Markierung in Kontrollversuchen verifiziert werden.



**Abbildung 3.16:** AlexaFluor®488-markierter Querschnitt durch ein junges Blatt von *S. officinale*. Die Inkubation des 3 µm dicken Schnittes mit dem spezifischen HSS-Antikörper und dem AlexaFluor®488-konjugierten Antikörper erfolgte wie in Abb. 3.15 beschrieben. Bei der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigten die Zellen der Bündelscheide eine Markierung mit AlexaFluor®488. **BS**-Bündelscheide, **EP**-Epidermis, **PP**-Palisadenparenchym, **SP**-Schwammparenchym. Der eingezeichnete Balken entspricht einer Länge von 20 µm.

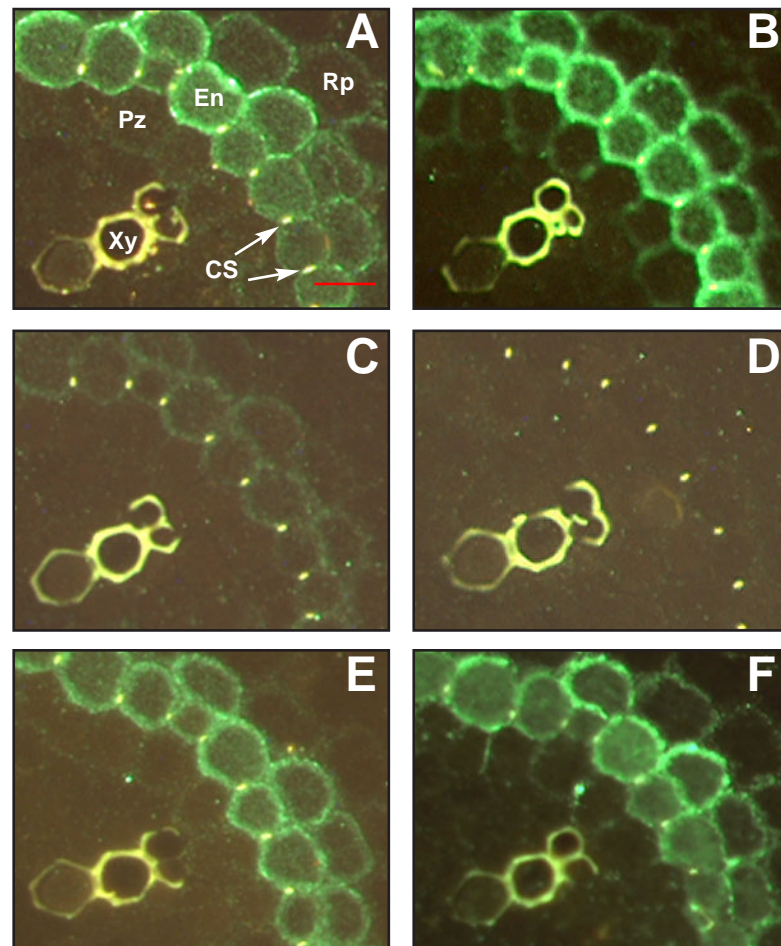
### 3.2.5.1 Kontrollversuche zur Spezifität der Markierung von *S. officinalis* Wurzeln

Die hohe Identität der HSS zur DHS von 74 % auf Aminosäureebene barg die Gefahr von Kreuzreaktionen des spezifischen HSS-Antikörpers mit der möglicherweise in allen Geweben vorkommenden DHS. Obwohl die HSS im vergleichenden Immunoblot (s. Abb. 3.12) um den Faktor 4 empfindlicher detektiert wurde als die DHS, konnte eine falsch positive Markierung im Gewebe zunächst nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um nachzuweisen, daß der affinitätsgereinigte Antikörper die HSS aus *S. officinale* auch wirklich spezifisch im Gewebe erkannt hatte, wurden die bereits in Kapitel 3.1.4.1 für *C. officinale* beschriebenen Kontrollversuche durchgeführt.

In Abb. 3.17 D erkennt man, daß bei einem dreifachen Überschuß an HSS-Protein im Vergleich zur Antikörperkonzentration die Markierung der Zellen der Endodermis verschwunden war. Bei Vorinkubation des Antikörpers mit einem Zehntel HSS-Protein hingegen wurde die Intensität der Markierung sichtlich abgeschwächt (Abb. 3.17 C). Nach

Vorinkubation des spezifischen HSS-Antikörpers mit den jeweils entsprechenden Mengen an DHS-Protein wurde keine Veränderung der Markierung im Vergleich zur Inkubation mit dem Antikörper ohne Vorinkubation beobachtet (Abb. 3.17 E und F). Somit konnte ausgeschlossen werden, daß die Markierung auch nur zum Teil auf eine Kreuzreaktion mit der im Gewebe möglicherweise ebenfalls exprimierten DHS zurückzuführen ist. Ebenso konnte eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit Fremdprotein ausgeschlossen werden, da eine Vorinkubation des Antikörpers mit einem dreifachen Überschuß an BSA-Protein ebenfalls keinen Einfluß auf die Markierung zeigte (Abb. 3.17 B).





**Abbildung 3.17:** Ausschnitte von FITC-markierten Wurzelquerschnitten (Schnitt-dicke  $3\text{ }\mu\text{m}$ ) von *S. officinale* aus den Kontrollversuchen zur Spezifität der Markierung. Die Vorinkubierung des Antikörpers und die anschließende Detektion erfolgten wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben. **CS**-Casparyscher Streifen, **En**-Endodermis, **Ph**-Phloem, **Pz**-Perizykel, **Rp**-Rindenparenchym, **Xy**-Xylem.

Detektiert wurde nach Inkubation mit dem HSS-Antikörper ohne Unterfütterung (**A**) sowie nach Vorinkubation mit jeweils einem Zehntel bzw. einem dreifachen Überschuss an HSS- (**C** und **D**) und DHS- (**E** und **F**) Protein. Zusätzlich wurde mit einem dreifachen Überschuss an BSA-Protein (**B**) unterfüttert. Der eingefügte Größenmarker entspricht einer Länge von  $10\text{ }\mu\text{m}$ .

### 3.3 Gewebespezifische Expression der HSS in *Heliotropium indicum*

Nachdem mit *C. officinale* (s. Kap. 3.1) und *S. officinale* (s. Kap. 3.2) zwei Vertreter aus der Familie der Boraginaceae ausgewählt wurden, die ihre PAs in erster Linie in der Wurzel synthetisieren, sollte nun mit *H. indicum* ein weiterer Vertreter der Familie untersucht werden, der zuvor in biochemischen Untersuchungen eine Biosynthese der PAs in den oberirdischen Organen gezeigt hatte (Frölich, 1996). Ein Vergleich zwischen der unter- und der oberirdischen Lokalisation sollte weitere Hinweise darüber geben, wie die Expression der HSS reguliert wird und ob sich der monophyletische Ursprung der HSS innerhalb der Boraginaceae auf der Ebene der gewebespezifischen Lokalisation widerspiegelt.

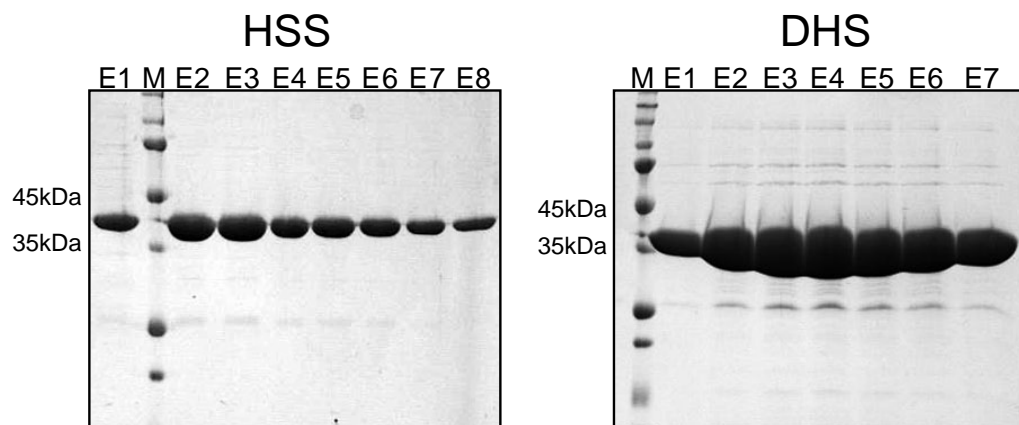
Der mehrjährige, ursprünglich aus Indien und Australien stammende Strauch *H. indicum* hat in früheren biochemischen Untersuchungen eine PA-Biosynthese in den oberirdischen Organen ergeben. In Fütterungsexperimenten mit radioaktiv markierten Vorstufen zeigten alle Organe des Sprosses einen Einbau dieser Vorstufen in das detektierte Endprodukt Indicin-*N*-oxid. In der Wurzel wurde zwar ein geringer Umsatz der radioaktiven Vorstufen zu Homospermidin beobachtet, dieses wurde jedoch nicht weiter zu PAs umgesetzt (Frölich, 1996).

In molekularbiologischen Untersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß die HSS in allen untersuchten Organen transkribiert wird (Reimann, 2007). Die Wurzel zeigte dabei jedoch ein signifikant schwächeres Signal in der RT-PCR als die oberirdischen Organe, was eine mögliche Erklärung für den von Frölich (1996) beobachteten geringeren Einbau der radioaktiv markierten Vorstufen in die Wurzeln ist.

#### 3.3.1 Reinigung der rekombinanten HSS und DHS aus *Heliotropium indicum*

Das bereits im Vorfeld dieser Arbeit durch Ligation in den linearisierten Vektor pET3a hergestellte Konstrukt aus der HSS cDNA mit einem 6x His-Tag konnte nicht für die Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) eingesetzt werden, da die im Anschluß an die Transformation gewachsenen Klone keine Expression der HSS aufwiesen. Erst nach erneuter Klonierung konnte die HSS wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben heterolog im *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) exprimiert und anschließend in einem Schritt unter Verwendung der Ni-NTA-Agarose bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt werden (Abb. 3.18). Die Neuklonierung der HSS erfolgte wie in Kapitel 3.1.1 für die DHS aus *C. officinale* beschrieben. Im Anschluß an die PCR mit den bereits vorliegenden genspezifischen

schen Primern (s. Tab. 2.1) wurde das gereinigte PCR Produkt jedoch davon abweichend mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nde*I geschnitten und in den Vektor pET3a ligiert. Die HSS wurde für die Herstellung und Reinigung eines spezifischen Antikörpers sowie für weitere Spezifitätsuntersuchungen benötigt. Um Untersuchungen zur Kreuzreaktivität dieses spezifischen HSS-Antikörpers mit der DHS durchführen zu können, wurde zusätzlich gereinigtes DHS-Protein benötigt. Dazu wurde an die bereits vorhandene Sequenz der DHS aus *H. indicum* ein His-Tag an den C-Terminus angehängt. Die 6 Histidin-Reste wurde mit Hilfe eines spezifischen Reverse-Primers (s. Tab. 2.1) eingefügt. Die PCR sowie alle folgenden Schritte erfolgten wie bereits für *C. officinale* beschrieben (s. Kap. 3.1.1). Die abschließende metallaffinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte in Analogie zur HSS unter Verwendung von Ni-NTA als Gelmatrix (Abb. 3.18).



**Abbildung 3.18:** Aufreinigung der rekombinanten HSS und DHS aus *H. indicum*. Gezeigt werden die Coomassie-gefärbten SDS-Gele (s. Kap. 2.4.3.1) nach der metallaffinitätschromatographischen Aufreinigung. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der Elutionsfraktionen (E1-E8). M= 14,4-116 kDa Proteinleiter (Fermentas)

### 3.3.2 Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die DHS im Western Blot

Mit einer Identität von 77 % auf Aminosäureebene zwischen HSS und DHS bestand auch bei *H. indicum* die Gefahr falsch positiver Signale auf Grund einer Kreuzreaktivität des spezifischen HSS-Antikörpers mit der DHS. Diese mögliche Kreuzreaktivität wurde wie



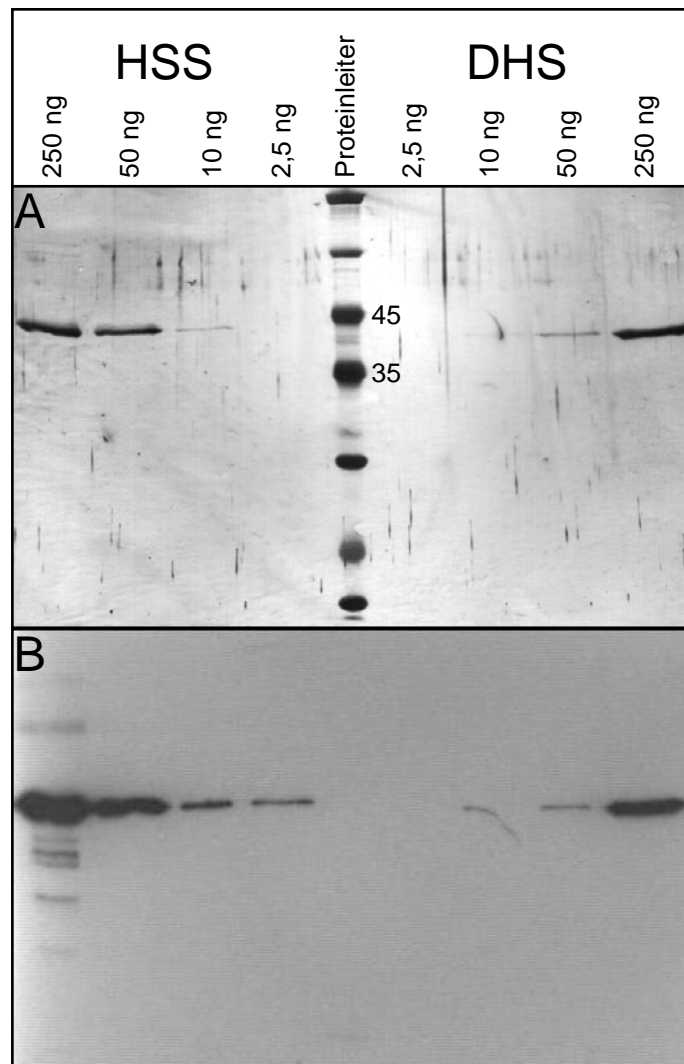
in Kapitel 3.1.2 beschrieben im Western Blot untersucht.

Die mit dem spezifischen Antikörper inkubierte Membran (Abb. 3.19 B) zeigt, daß die DHS bis zu einer Konzentration von 10 ng detektiert wurde, wohingegen die HSS noch bei 2,5 ng ein deutliches Signal aufwies. Dabei war das Signal der HSS bei 10 ng deutlich intensiver als das Signal der DHS bei 50 ng. Die HSS konnte also unter der Voraussetzung, daß gleiche Konzentrationen aufgetragen werden, mindestens um den Faktor 5 empfindlicher detektiert werden. Dieser Faktor entsprach damit den bereits für *C. officinale* und *S. officinale* erhaltenen Daten und paßt gut ins Bild, da die HSS- und DHS-codierenden Sequenzen in den drei Pflanzen einen annähernd gleich hohen Grad an Identität aufweisen.

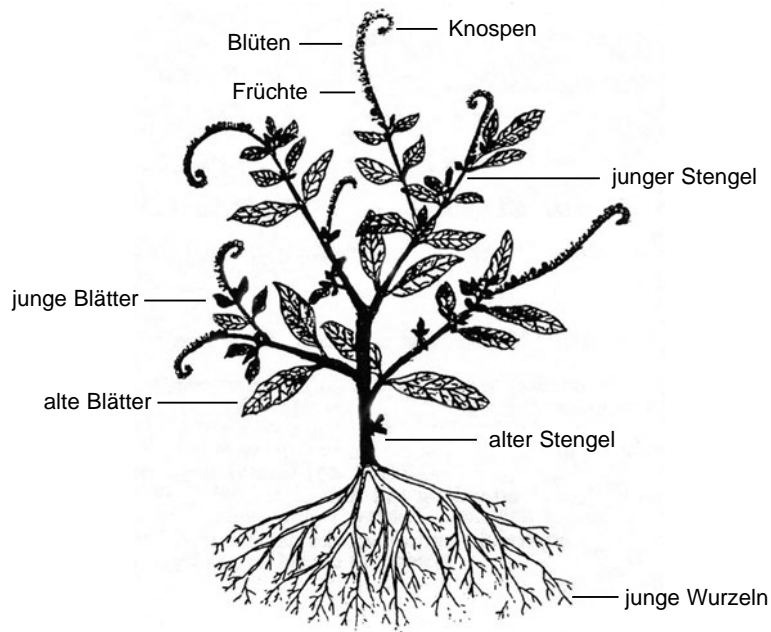
### 3.3.3 Expressionsanalyse durch Western Blot

Durch den Immunoblot sollte die Expression der HSS in den verschiedenen Geweben von *H. indicum* untersucht (s. Abb. 3.20) und mit den Daten aus parallel dazu durchgeführten Transkriptionsanalysen von A. Reimann verglichen werden. Die positiven Gewebe konnten dann für die Immunolokalisation eingesetzt werden.

In Abbildung 3.21 ist zu erkennen, daß die HSS im jungen Blatt, im jungen Sproß und in der Knospe von dem spezifischen Antikörper detektiert wurde. In allen übrigen untersuchten Organen konnte keine HSS im Western Blot nachgewiesen werden. Bei Betrachtung des Blots fällt die starke HSS-spezifische Bande im jungen Blatt auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den Arbeiten von Fröhlich (1996), die mit Hilfe von Fütterungsexperimenten die jungen Blätter als Organ mit der höchsten PA-Biosyntheserate identifiziert haben. Auch die Beobachtungen, wonach der junge Sproß im Vergleich zum alten Sproß sowie die Knospe im Vergleich zur Blüte eine signifikant höhere Einbaurate der radioaktiven Vorstufen gezeigt haben, wurde im Western Blot bestätigt: Während im jungen Sproß und in der Knospe noch ein schwaches Signal bei 44 kDa detektiert wurde, war in den Extrakten aus dem alten Sproß und der Blüte keine entsprechende Bande nachweisbar. Auch im alten Blatt konnte keine Expression der HSS nachgewiesen werden. Möglicherweise lag die Expression in diesen älteren Organen unter der Nachweisgrenze. Die transkribierte HSS hingegen konnte durch RT-PCR in allen Organen mit bis auf die Wurzel annähernd gleicher Intensität nachgewiesen werden (Reimann, 2007). In der jungen Wurzel wurde die HSS deutlich schwächer transkribiert und konnte möglicherweise aus diesem Grund auf Proteinebene im Western Blot nicht mehr detek-



**Abbildung 3.19:** Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die HSS und DHS aus *H. indicum* im Western Blot. Jeweils gleiche Mengen von HSS und DHS wurden im SDS-Gel (s. Kap. 2.4.2) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. Kap. 2.5.3). Die PVDF-Membran wurde wie in Kapitel 2.5.3.3 beschrieben nacheinander mit dem spezifischen HSS Antikörper ( $OD_{280}=1,11$ ) in einer 1:10000 Verdünnung und dem sekundären Antikörper (1:3300) inkubiert und anschließend detektiert mit dem ECL-Kit (B). Im Anschluß daran wurde die Membran mit Indian-Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt (A). Zur Identifizierung der Banden wurde zusätzlich ein 14,4-116 kDa Proteinmarker (Fermentas) aufgetragen.



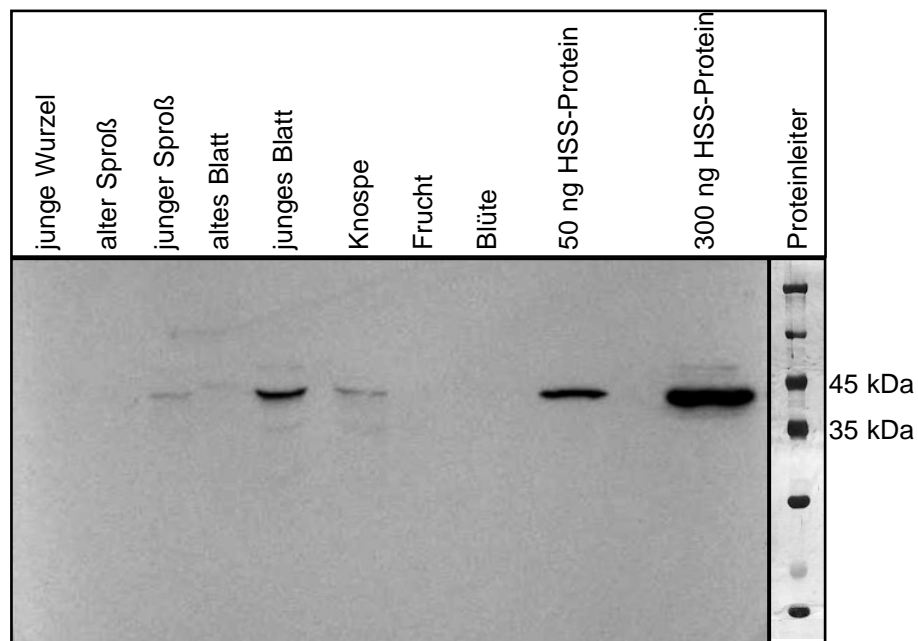
**Abbildung 3.20:** Schema einer *H. indicum* Pflanze (Frölich, 1996, modifiziert).

tiert werden.

Die immunologischen Untersuchungen bestätigen somit zum Teil die im Vorfeld aus biochemischen Versuchen gewonnenen Daten und rücken vor allem das junge Blatt in den Fokus weiterer Untersuchungen mit dem Ziel der gewebespezifischen Lokalisation der HSS auf zellulärer Ebene.

### 3.3.3.1 Untersuchung der HSS-Expression in verschiedenen Blattstadien von *H. indicum*

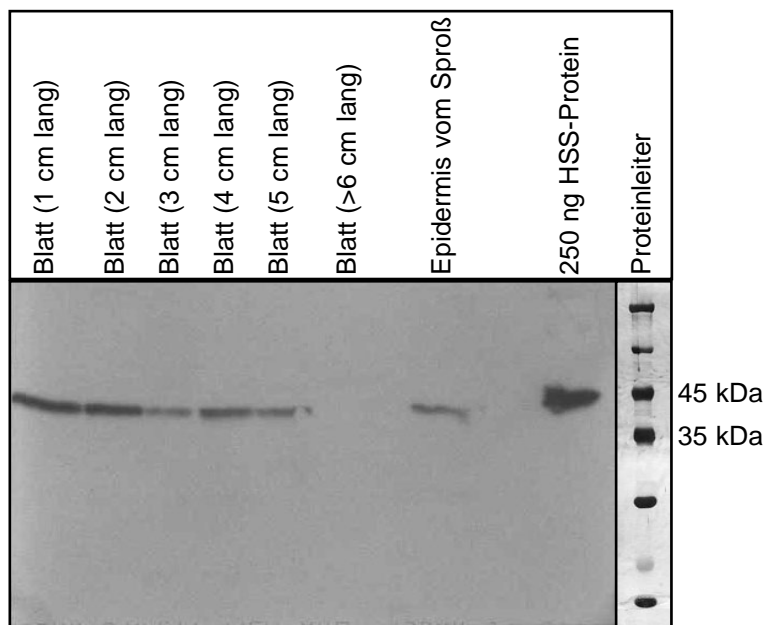
In früheren Untersuchungen wurde ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Blätter und der PA-Biosynthese nachgewiesen: In den jungen Blättern erfolgte der Einbau der radioaktiv markierten Vorstufen wesentlich effektiver als in den parallel dazu untersuchten alten Blättern (Frölich, 1996). Die Ergebnisse des Western Blots scheinen dies zu bestätigen. Während die jungen Blätter ein starkes Signal bei 44 kDa zeigten, konnte die HSS in den alten Blättern nicht mehr nachgewiesen werden. Eine genaue Untersuchung verschiedener Blattstadien sollte zeigen, ob die Expressionsstärke der HSS über die verschiedenen Blattstadien eine Veränderung aufzeigt und ab welchem Stadium keine HSS



**Abbildung 3.21: Western Blot verschiedener Gewebe von *H. indicum*.** Jeweils 20 µg isoliertes Gesamtprotein aus den Geweben wurden im SDS-Gel (s. Kap. 2.4.2) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. Kap. 2.5.3). Im Anschluß an die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:10000, OD<sub>280</sub>=1,11) und dem sekundären Antikörper (1:3300) erfolgte die Detektion mit dem ECL-Kit. Der 14,4-116 kDa Größenmarker (Fermentas) wurde nach dem Blotten von der Membran abgetrennt und mit Indian Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt, um die Größe der Banden abschätzen zu können.

mehr im Western Blot nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurden von einer Pflanze Blätter verschiedener Größe geerntet und wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben im Western Blot untersucht.

Wie aus der Abbildung 3.22 hervorgeht, korreliert die Blattgröße und damit das Alter tatsächlich mit der Expression der HSS. Das stärkste Signal ergab das kleinste und somit



**Abbildung 3.22: Western Blot zur Untersuchung der HSS-Expression in verschiedenen Blattstadien von *H. indicum*.** Die Durchführung des Western Blots sowie die Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper erfolgten wie bei Abb. 3.21 beschrieben. Die Spur mit der 14,4-116 kDa Proteinleiter (Fermentas) wurde nach dem Blotten abgetrennt und separat mit Indian-Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt, um die Größe der Banden bestimmen zu können.

jüngste Blatt (Spur 1). Die Stärke des Signals nimmt dann kontinuierlich mit Zunahme der Blattgröße ab (Spur 2-5), bis ab einer Blattgröße von 6 cm Länge keine HSS mehr nachweisbar war (Spur 6). Möglicherweise wird in den ganz alten Blättern mit beginnender Seneszenz die Expression der HSS abgeschaltet.

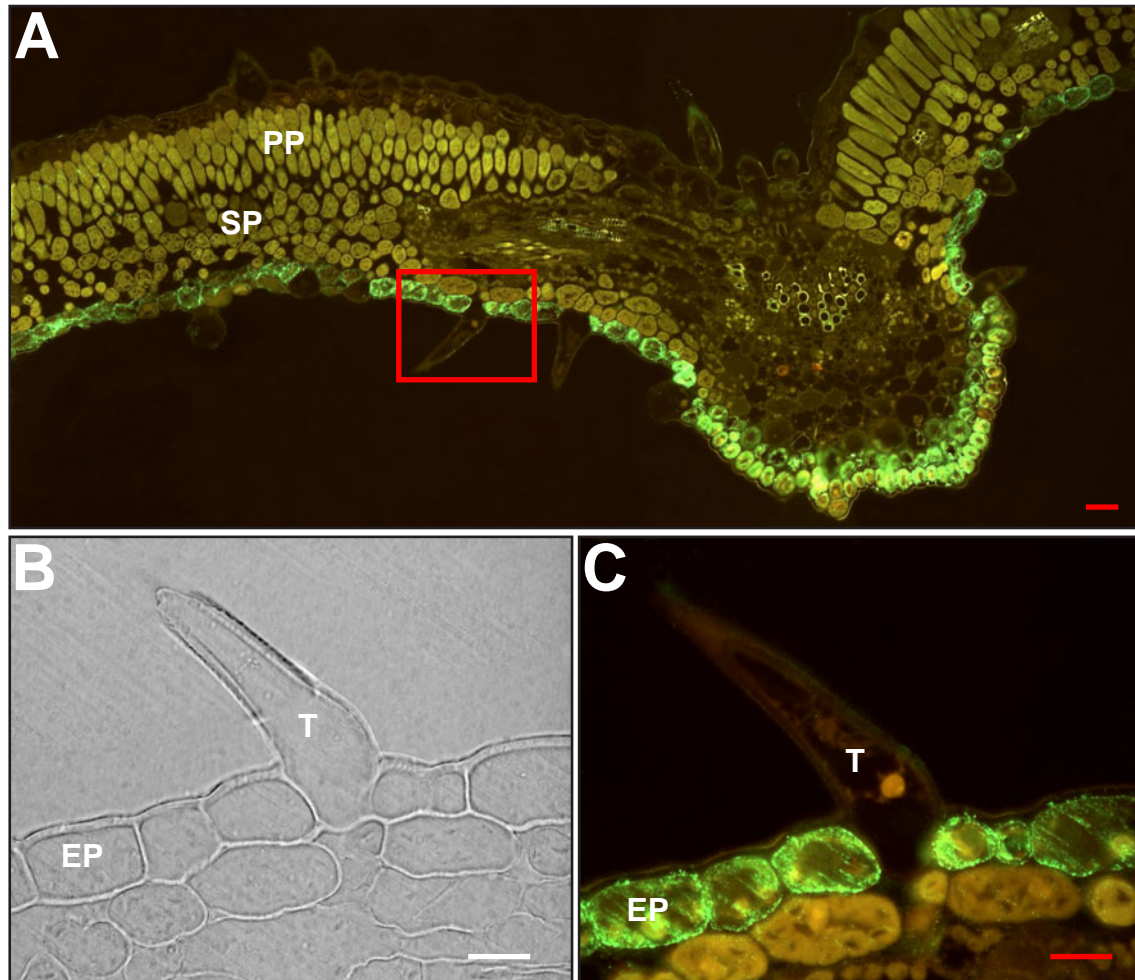
Vor diesem Hintergrund erschien die weitere Untersuchung der jungen Blätter mit den Techniken der Immunolokalisation am aussichtsreichsten.

### 3.3.4 Immunolokalisation der HSS in den jungen Blättern von *Heliotropium indicum*

Die ganz jungen, ca. 1 cm langen Blätter wurden in den Kunststoff Technovit 7100 (s. Kap. 2.5.5.2) eingebettet und für die mikroskopischen Untersuchungen entsprechend Kapitel 2.5.5 vorbereitet. In Abbildung 3.23 A ist ein 3  $\mu$ m dicker Querschnitt durch ein junges Blatt von *H. indicum* in der Übersicht dargestellt. Hierbei handelt es sich um eine Panorama-Aufnahme, die unter der Verwendung einer speziellen Software (PhotoStitch, Canon) aus 3 Einzelaufnahmen zusammengesetzt worden ist. Gut zu erkennen sind die Zellen des einschichtigen Palisaden- und mehrschichtigen Schwammparenchyms im rechten Bereich der Abbildung. Die überall im Blatt vorkommenden Chloroplasten erscheinen bei der eingesetzten Anregungswellenlänge von 495 nm gelb fluoreszierend. In der Mitte ist der Hauptnerv (Mittelrippe) des Blattes mit Xylem und Phloem zu erkennen. Nach der Inkubation mit dem spezifischen Antikörper und der anschließenden Detektion mit dem FITC-konjugierten sekundären Antikörper war die Markierung auf die Zellen der unteren Epidermis beschränkt. Interessanterweise zeigten die aus der Epidermis hervorgegangenen Haarzellen keine Reaktion mit dem spezifischen Antikörper. Besonders deutlich wird dies in der Ausschnittsvergrößerung (s. Abb. 3.23 C). Weder die angrenzenden Parenchymzellen noch die epidermale Haarzelle zeigten die FITC-charakteristische grüne Fluoreszenz, sie konnte somit eindeutig auf nicht weiter differenzierte Zellen der unteren Epidermis begrenzt werden. Die Aufnahme des gleichen Schnittes im Hellfeld (s. Abb. 3.23 B) verdeutlicht noch einmal, daß es sich bei dem Trichom um eine einzellige Haarzelle, die aus der Epidermis hervorgegangen ist, handelt. Trichome entwickeln sich schon früh im Anfangsstadium eines neu entstehenden Blattes und unterscheiden sich hinsichtlich Anatomie und Funktion von den gleichzeitig entstehenden Epidermiszellen (Raven, 2000), was eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche gewebespezifische Expression der HSS wäre.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals die HSS, das Eingangsenzym der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese, in oberirdischen Pflanzenorganen immunologisch lokalisiert werden. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beleg für die höchst individuelle Regulierung der gewebespezifischen Expression der HSS innerhalb der Familie der Boraginaceae auf der einen sowie darüber hinaus innerhalb der bereits untersuchten Angiospermen auf der anderen Seite.

Bei weiteren mikroskopischen Untersuchungen am jungen Blatt fiel eine zusätzliche spe-



**Abbildung 3.23:** FITC-markierter Querschnitt durch ein junges Blatt von *H. indicum*. Der 3  $\mu\text{m}$  dicke Querschnitt wurde nacheinander mit dem spezifischen HSS-Antikörper in einer 1:100 Verdünnung ( $\text{OD}_{280}=1,11$ ) und dem sekundären FITC-Antikörper (1:100) inkubiert. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben. In der Übersicht (A) erkennt man die FITC-markierten Zellen der unteren Epidermis. Die gelbe Autofluoreszenz der Chloroplasten ist im gesamten Gewebe sichtbar. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt ein Trichom mit angrenzenden Epidermiszellen im Hellfeld (B) und unter Fluoreszenz (C). Die Markierung der Epidermis ist im Bereich der Haarzelle unterbrochen. **EP**-Epidermis, **PP**-Palisadenparenchym, **SP**-Schwammparenchym, **T**-Trichom. Der eingezeichnete Größenmarker entspricht in allen Abbildungen einer Länge von 10  $\mu\text{m}$ .

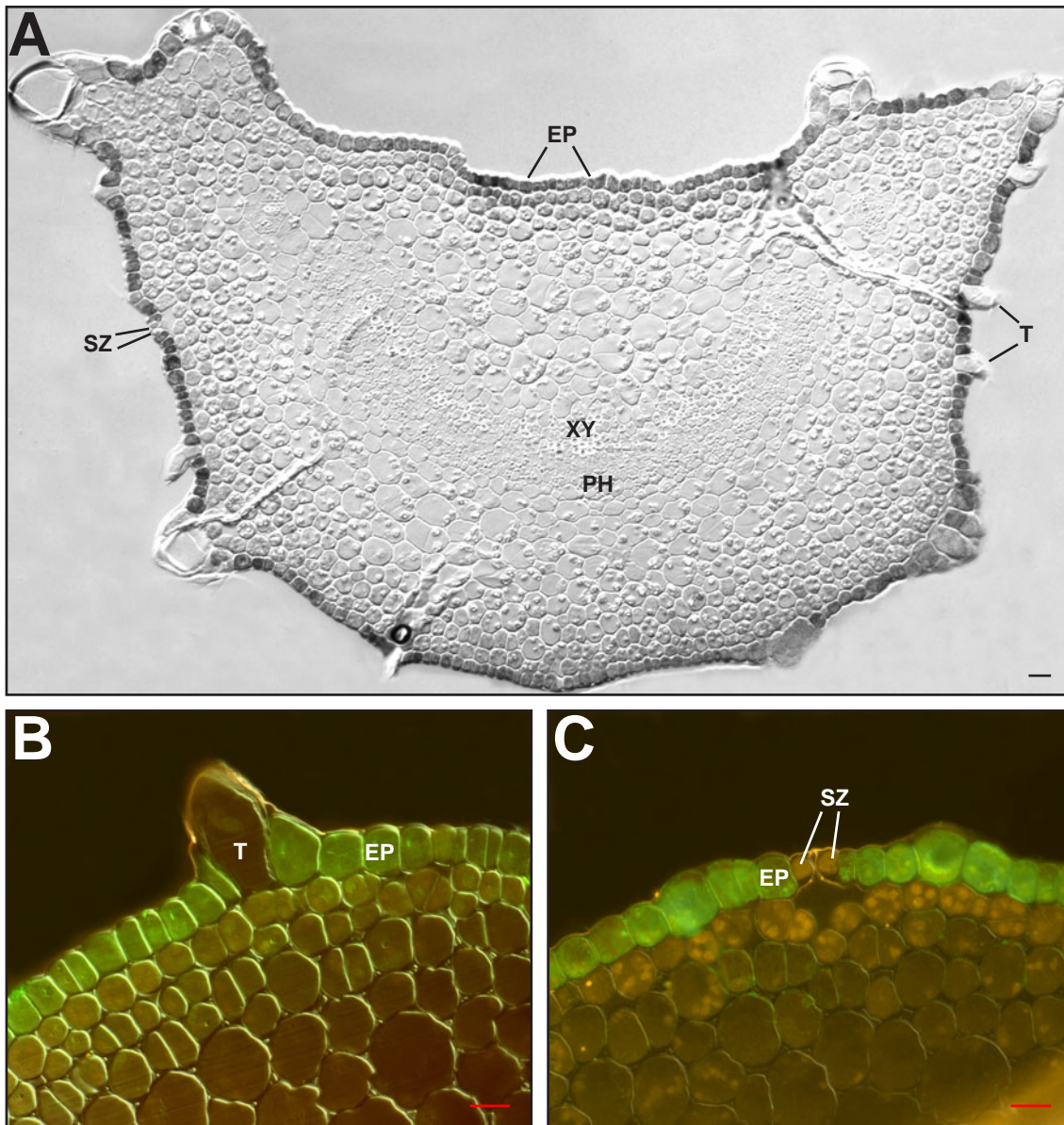
zifische Markierung der Epidermiszellen im Bereich des Blattstiels auf. Daraufhin wurden gezielt die Stiele von jungen Blättern in den Kunststoff Technovit 7100 eingebettet, mit dem spezifischen Antikörper inkubiert und sowohl mit Immunogold und anschließender Verstärkung mit Silver-Enhancement (s. Kap. 2.5.5.6) als auch mit FITC (s. Kap. 2.5.5.5) detektiert. Wie man in der Hellfeld-Aufnahme (s. Abb. 3.24 A) eines Querschnittes durch den Stiel eines jungen Blattes erkennen kann, erfolgte nach der Signalverstärkung mit dem Silbersalz eine deutliche Schwärzung der Zellen der Epidermis. Die Markierung der gesamten Epidermis verlief durchgängig bis auf die aus ihr hervorgegangenen Trichome und Schließzellen. Wie schon bei der mikroskopischen Untersuchung des jungen Blattes (s. Abb. 3.23) beobachtet, zeigte sich nun auch im Blattstiel, daß diese in die Epidermis eingelagerten Zellen mit besonderer Funktion nicht mit dem spezifischen Antikörper reagiert haben und somit vermutlich von der PA-Biosynthese ausgenommen sind. Die mit FITC detektierten Detailaufnahmen belegen eindeutig, daß weder die Haarzelle (s. Abb. 3.24 B) noch die Schließzellen (s. Abb. 3.24 C) mit dem spezifischen HSS-Antikörper reagiert haben, nur die sie umgebenden Zellen der Epidermis waren markiert. Die Schließ- und die bereits erwähnten Haarzellen besitzen für die Pflanze eine besondere Funktion und unterscheiden sich sowohl anatomisch als auch physiologisch von den sie umgebenden Epidermiszellen, was eine mögliche Erklärung für die Unterbrechung der Markierung im Bereich dieser Zellen wäre.

### 3.3.5 Kontrollversuche zur Spezifität der Markierung

Ob der affinitätsgereinigte, gegen die HSS aus *H. indicum* gerichtete Antikörper die native HSS spezifisch im Gewebe erkannt hatte, wurde wie bei *C. officinale* (s. Kap. 3.1.4.1) und *S. officinale* (s. Kap. 3.2.5.1) in verschiedenen Kontrollexperimenten überprüft. Eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit dem Gewebe konnte ausgeschlossen werden, da nach Inkubation mit 1x PBS an Stelle des primären Antikörpers keine Immunantwort auftrat. Die weiteren Unterfütterungsversuche mit der rekombinanten HSS und DHS sowie mit BSA-Protein wurden wie für *C. officinale* beschrieben durchgeführt.

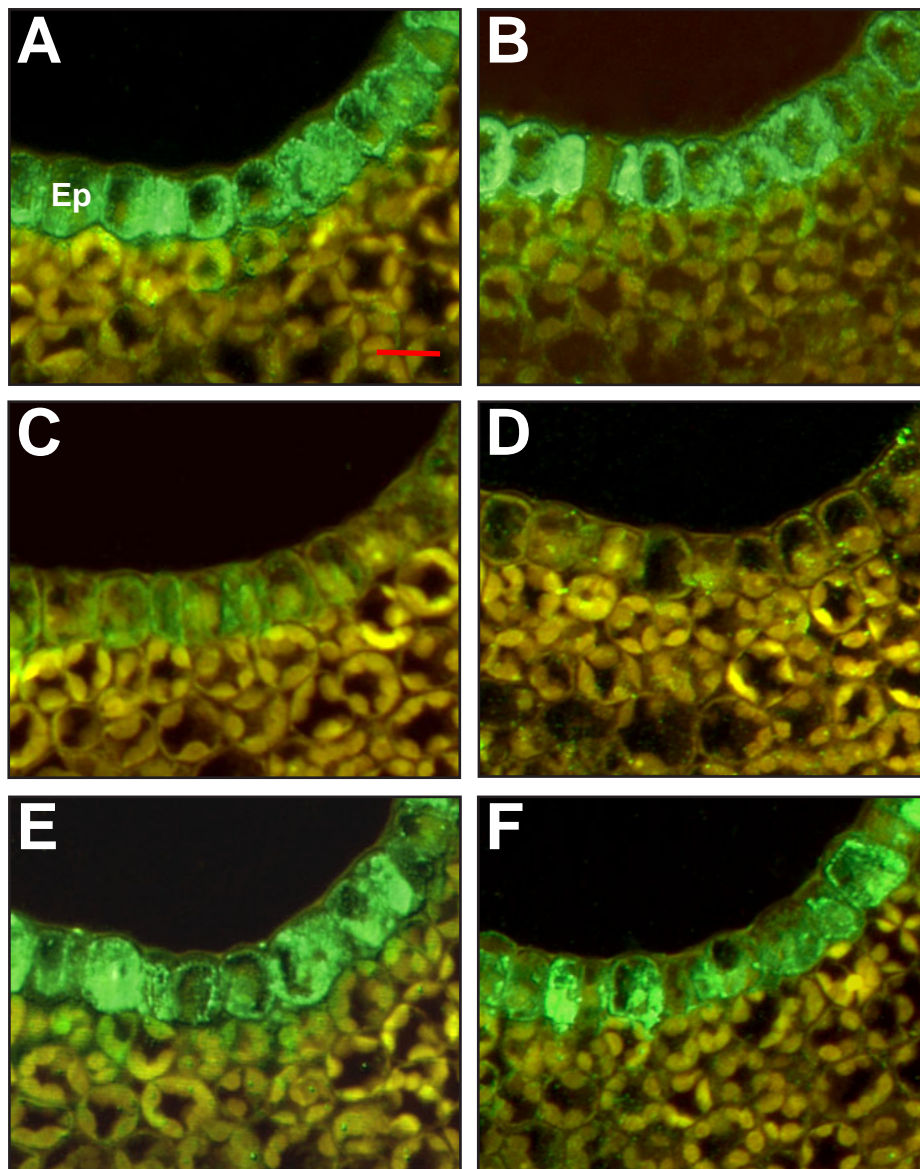
In der Abbildung 3.25 C erkennt man, daß nach Vorinkubation des spezifischen Antikörpers mit einem dreifachen Überschuß an HSS-Protein im Verhältnis zur IgG-Konzentration keine Immunantwort mehr auftrat. Eine deutliche Schwächung der Markierung konnte nach vorheriger Inkubation des Antikörpers mit einem Zehntel der Konzentration von HSS-Protein im Vergleich zur IgG-Konzentration beobachtet werden (Abb. 3.25 D). Mit





**Abbildung 3.24:** Querschnitt durch den Blattstiel von *H. indicum* in der Übersicht und im Detail. Die 3 µm dünnen Schnitte wurden zunächst mit dem spezifischen HSS-Antikörper in einer 1:100 Verdünnung ( $OD_{280}=1,11$ ) inkubiert und anschließend wahlweise mit Immunogold (s. Kap. 2.5.5.6) oder FITC (s. Kap. 2.5.5.5) detektiert. Abb. A zeigt den gesamten Querschnitt im Hellfeld. Markiert sind die Zellen der Epidermis mit Ausnahme der Haar- und Schließzellen. Die unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentierten Detailaufnahmen der Haarzelle (B) und der Schließzelle (C) verdeutlichen die Begrenzung der Markierung auf die Zellen der Epidermis. **EP**-Epidermis, **PH**-Phloem, **SZ**-Schließzelle, **T**-Trichom, **XY**-Xylem. Der eingezeichnete Balken entspricht in Abb. A einer Länge von 20 µm und in den Abb. B und C einer Länge von 10 µm.

rekombinanter DHS in gleicher Weise durchgeführte Unterfütterungen des spezifischen Antikörpers erbrachten keine sichtbare Veränderung der Markierung im Vergleich zur Inkubation mit dem spezifischen Antikörper ohne Vorinkubation (Abb. 3.25 E und F). Eine Kreuzreaktion des HSS-Antikörpers mit im Gewebe möglicherweise ebenfalls vorkommende DHS trägt somit nicht zur beobachteten Markierung bei. Ebenso unwahrscheinlich erschien eine nicht spezifische Reaktion des Antikörpers mit Fremdprotein, da die zusätzlich durchgeführte Unterfütterung mit einem dreifachen Überschuß BSA-Protein im Verhältnis zur Konzentration des Antikörpers keinen Einfluß auf die Intensität der Markierung zeigte (Abb. 3.25 B).



**Abbildung 3.25:** Ausschnitte von FITC-markierten Blattquerschnitten (Schnittdicke 3 µm) von *H. indicum* aus den Kontrollversuchen zur Spezifität der Markierung. Die Vorinkubierung des Antikörpers und die anschließende Detektion erfolgten wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben. **Ep**-Epidermis.

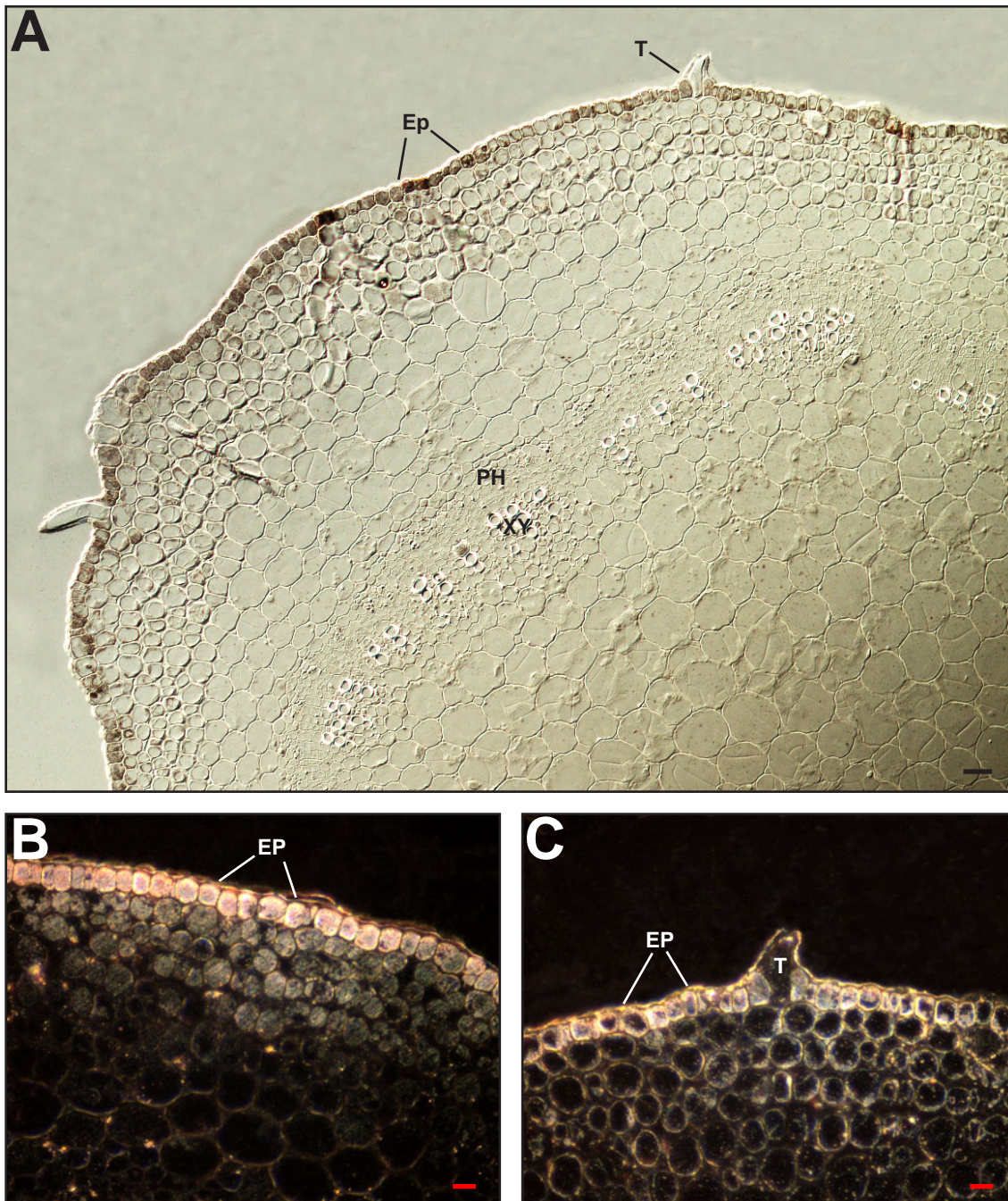
Detektiert wurde nach Inkubation mit dem HSS-Antikörper ohne Unterfütterung (**A**) sowie nach Vorinkubation mit jeweils einem Zehntel bzw. einem dreifachen Überschuß an HSS- (**C und D**) und DHS- (**E und F**) Protein. Zusätzlich wurde mit einem dreifachen Überschuß an BSA-Protein (**B**) unterfüttert. Der eingefügte Größenmarker entspricht einer Länge von 10 µm.

### 3.3.6 Immunolokalisation der HSS im jungen Sproß von *Heliotropium indicum*

Nach der gewebespezifischen Lokalisation der HSS im jungen Blatt und im Blattstiel sollte nun überprüft werden, ob die HSS im jungen Sproß ebenfalls in den Zellen der Epidermis exprimiert wird. Im Western Blot (s. Abb. 3.21) konnte die HSS, wenn auch deutlich schwächer als im jungen Blatt, bereits im jungen Sproß nachgewiesen werden. Falls die HSS wie im jungen Blatt auf die Zellen der Epidermis beschränkt ist, dann könnte die schwache Bande im Western Blot auch aus der stärkeren „Gewebe“-Verdünnung resultieren, da das Verhältnis von Oberfläche und Volumen im Sproß ungünstiger ist als im Blatt. Um diese Überlegungen zu überprüfen, wurde gezielt die Epidermis der jungen Sprosse präpariert, das enthaltene Gesamtprotein isoliert und wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben im Western Blot untersucht. In Abbildung 3.22 erkennt man ein deutliches HSS-spezifisches Signal bei 44 kDa, welches im Vergleich zum Signal nach Isolierung des Gesamtproteins aus dem gesamten Sproß (s. Abb. 3.21) eindeutig an Intensität gewonnen hat. In beiden Western Blots wurden die gleichen Mengen an Gesamtprotein eingesetzt und die Durchführung und Detektion erfolgten in analoger Weise, was eine Vergleichbarkeit der beiden Banden ermöglicht. Diese Beobachtung machte eine Expression der HSS in der Epidermis des jungen Sprosses wahrscheinlich.

1 cm lange Segmente junger Sprosse wurden in Technovit 7100 (s. Kap. 2.5.5.2) eingebettet, am Mikrotom geschnitten und nacheinander mit dem spezifischen HSS-Antikörper und dem sekundären mit Goldpartikeln konjugierten Antikörper inkubiert. Nach Verstärkung des Signals mit dem Silver Enhancement-Kit zeigte sich im Hellfeld nach ca. 10 min eine deutliche Schwarzfärbung der Epidermis. In der im Hellfeld aufgenommenen Übersichtsaufnahme (Abb. 3.26 A) eines 3 µm dünnen Querschnitts eines jungen Seitentriebs zeigte die gesamte Epidermis eine starke Immunantwort, die nur im Bereich der Haarzellen und Spaltöffnungen unterbrochen wurde. Diese Beobachtung wurde zuvor schon im jungen Blatt sowie im Blattstiel gemacht und bestätigte die Vermutung einer einheitlichen gewebespezifischen Expression der HSS in den oberirdischen Organen von *H. indicum*. Besonders deutlich wird diese sensibel regulierte gewebespezifische Expression bei den Ausschnittsvergrößerungen (Abb. 3.26 B und C), die unter Verwendung eines Dunkelfeldkondensors entstanden sind. Die Haarzelle (Abb. 3.26 C) zeigte keine Markierung mit dem spezifischen HSS-Antikörper, wohingegen die angrenzenden Zellen der Epidermis im Dunkelfeld ein starkes Signal aufwiesen. Durch die Mikroskopie im Dunkelfeld konnte zusätzlich der Kontrast zwischen markierten und nicht markierten Zellen





**Abbildung 3.26:** Querschnitt durch den jungen Sproß von *H. indicum* in der Übersicht und im Detail. Die 3 µm dünnen Schnitte wurden zunächst mit dem spezifischen HSS-Antikörper in einer 1:100 Verdünnung ( $OD_{280}=1,11$ ) inkubiert und anschließend mit Immunogold (s. Kap. 2.5.5.6) detektiert. Abb. A zeigt einen Teil des Querschnitts im Hellfeld. Markiert sind die Zellen der Epidermis mit Ausnahme der Haarzellen. Die im Dunkelfeld dokumentierten Detailaufnahmen der Epidermis (B) und der Haarzelle (C) verdeutlichen die Begrenzung der Markierung auf die Zellen der Epidermis. **EP**-Epidermis, **PH**-Phloem, **T**-Trichom, **XY**-Xylem. Der eingezeichnete Balken entspricht in Abb. A einer Länge von 20 µm und in den Abb. B und C einer Länge von 10 µm.

im Gegensatz zur Mikroskopie im Hellfeld erhöht werden. Wie in der Abbildung 3.26 B zu erkennen ist, zeigten die unten an die Epidermis angrenzenden Kollenchymzellen im Dunkelfeld ebenfalls ein schwaches Signal. Es konnte also zunächst nicht ausgeschlossen werden, daß die Markierung über die Zellen der Epidermis hinausging. Hier sollte die Elektronenmikroskopie weitere Aufschlüsse über die genaue subzelluläre Lokalisation der HSS erbringen (s. Kap. 3.3.8).

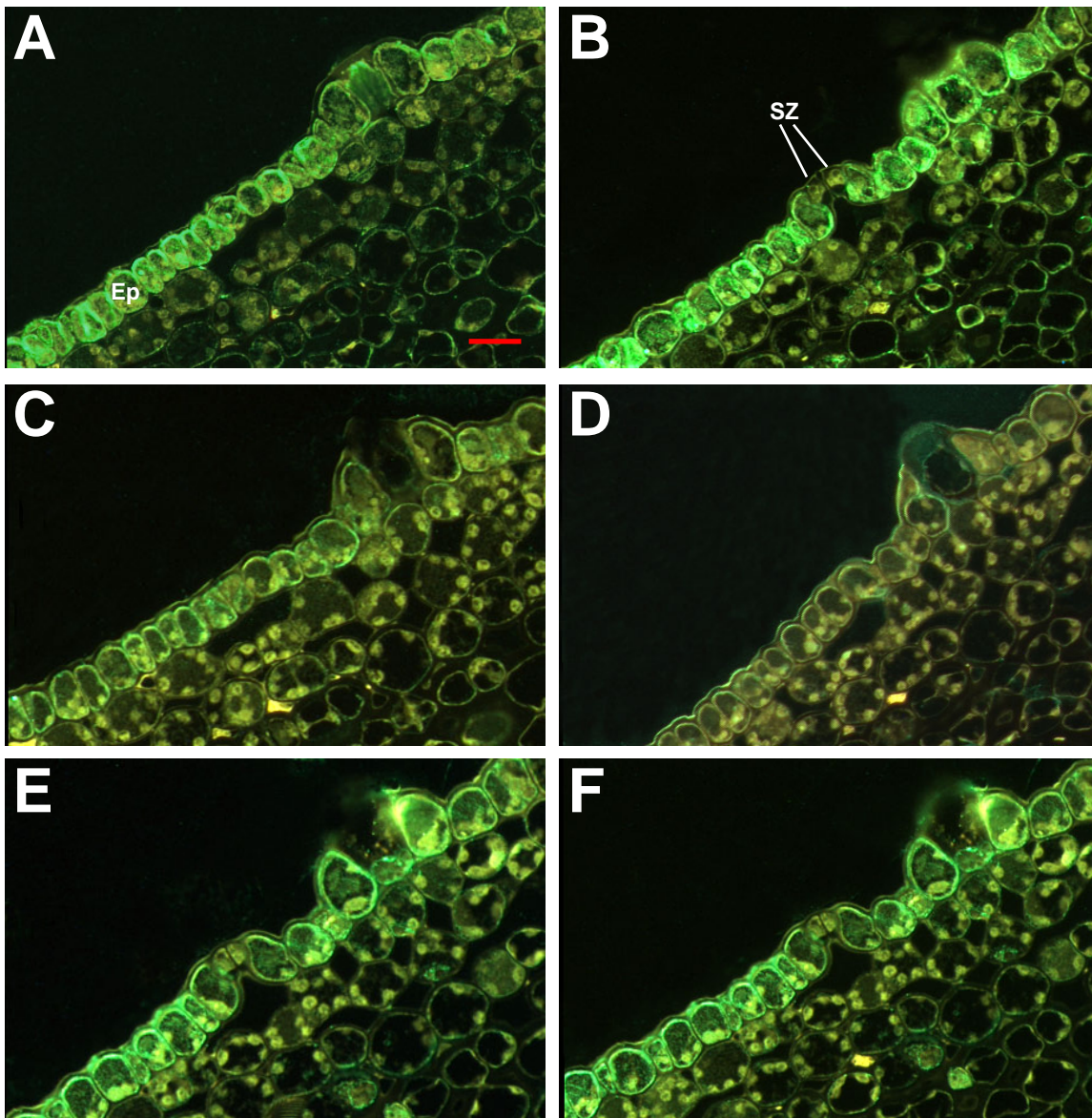
Mit der Knospe gab es noch ein weiteres oberirdisches Organ, welches im Western Blot (s. Abb. 3.21) ein HSS-spezifisches Signal ergeben hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur noch mit ersten Einbettungen der Knospe begonnen, wobei die HSS bisher im Gewebe der Knospe noch nicht nachgewiesen werden konnte. Bei der Betrachtung der Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop war nur die sehr starke gelbe Autofluoreszenz der sich ausbildenden Staubblätter zu erkennen. Das übrige Gewebe zeigte nach Inkubation mit dem spezifischen Antikörper keine Immunantwort. Bei *H. indicum* sitzen die Knospen neben den Blüten und den Früchten auf einem Stiel und bilden somit den als Wickel bezeichneten Blütenstand. Es wäre denkbar, daß die HSS in der Epidermis dieser Blütenstandsachse lokalisiert ist, eine ähnliche Beobachtung wurde ja auch in den Blattstielen der jungen Blätter gemacht. Hier bietet sich ein Ansatzpunkt, um die HSS in der Zukunft auch in diesem Knospen-tragenden Sproß gewebespezifisch zu lokalisieren.

### 3.3.7 Kontrollversuche zur Spezifität der Markierung

Auch für den Sproß mußte die Spezifität der Markierung mit Hilfe von Kontrollexperimenten bewiesen werden. Die Durchführung orientierte sich dabei an die bereits etablierten und im Kapitel 3.1.4.1 für *C. officinale* beschriebenen Unterfütterungsversuche mit aufgereinigtem HSS- und DHS-Protein.

Eine Vorinkubation des HSS-Antikörpers mit einem dreifachen Überschuß an HSS-Protein im Verhältnis zur Antikörper-Konzentration bewirkte ein Ausbleiben der Immunantwort (Abb. 3.27 D). Eine deutliche Abschwächung der Markierung resultierte aus der vorherigen Inkubation des Antikörpers mit einem Zehntel an HSS-Protein im Vergleich zur IgG-Konzentration (Abb. 3.27 C). Parallel dazu durchgeführte Inkubationen mit den gleichen Konzentrationen DHS-Protein bewirkten keine Veränderung der Signalintensität (Abb. 3.27 E und F). Eine Unterfütterung des Antikörpers mit dem dreifachen Überschuß an BSA-Protein hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Intensität der Markierung, womit eine unspezifische Reaktion mit Fremdprotein ausgeschlossen





**Abbildung 3.27:** Ausschnitte von FITC-markierten Sproßquerschnitten (Schnittstärke 3  $\mu\text{m}$ ) von *H. indicum* aus den Kontrollversuchen zur Spezifität der Markierung. Die Vorinkubierung des Antikörpers und die anschließende Detektion erfolgten wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben. **Ep**-Epidermis **SZ**-Schließzelle.

Detektiert wurde nach Inkubation mit dem HSS-Antikörper ohne Unterfütterung (**A**) sowie nach Vorinkubation mit jeweils einem Zehntel bzw. einem dreifachen Überschuss an HSS- (**C** und **D**) und DHS- (**E** und **F**) Protein. Zusätzlich wurde mit einem dreifachen Überschuss an BSA-Protein (**B**) unterfüttert. Der eingefügte Größenmarker entspricht einer Länge von 10  $\mu\text{m}$ .

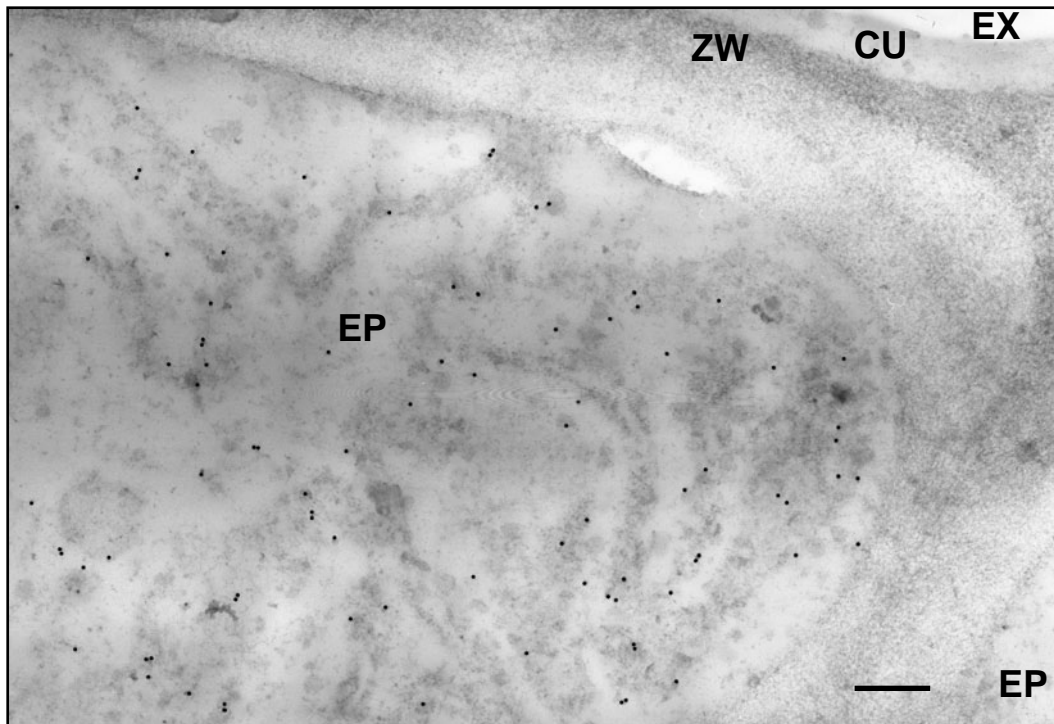
werden konnte. Ebenso konnte eine unspezifischen Reaktion des sekundären Antikörpers ausgeschlossen werden, da die Inkubation der Schnitte mit 1x PBS anstatt des HSS-Antikörpers keine Immunantwort ergab. Dies bedeutet, daß der aufgereinigte HSS-Antikörper die HSS im Gewebe spezifisch erkannt hatte.

### 3.3.8 Subzelluläre Lokalisation

Bisherige Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation bestätigten die von Böttcher biochemisch ermittelten Daten, wonach die HSS löslich und im Cytosol lokalisiert ist (Böttcher et al., 1993). In der Wurzel von *S. vernalis* konnte die HSS cytosolisch im Plasmasaum um die große zentrale Vakuole in den Zellen der Endodermis und angrenzenden Zellen des Rindenparenchyms gefunden werden (Moll et al., 2002). Ebenfalls im Plasmasaum war die HSS in den Zellen des Rindenparenchyms der jungen, weißen Wurzeln von *E. cannabinum* lokalisiert worden (Anke et al., 2004). Interessant erschien nun die Frage, ob die HSS in den Epidermiszellen des jungen Sprosses von *H. indicum* auch als lösliches Protein im Cytosol vorliegt. Ferner sollte die Untersuchung mit TEM zeigen, ob die Markierung im jungen Sproß auf die Zellen der Epidermis beschränkt ist oder die angrenzenden Kollenchymzellen einschließt. Die Auswertung im Dunkelfeld (s. Kap. 3.3.6) lieferte Hinweise für eine Expression der HSS in den Zellen des Kollenchyms. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Gewebeproben neu eingebettet, da der bisher verwendete Kunststoff Technovit 7100 keine ausreichende Härte aufwies. Die Aufarbeitung und Einbettung der Proben in den Kunststoff Unicryl erfolgten wie im Kapitel 2.5.5.3 beschrieben, wobei die Auspolymerisation des Kunststoffs unter UV bei 4°C über einen Zeitraum von mehreren Tagen durchgeführt wurde. Da die Aufbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie sehr zeitaufwendig ist, wurden die eingebetteten Proben vor dem Schneiden am Ultramikrotom mit der Immunogold-Markierung (s. Kap. 2.5.5.6) und anschließendem Silver-Enhancement unter dem Lichtmikroskop auf eine spezifische Markierung getestet. Zeigten die Zellen der Epidermis dabei eine ausreichend starke Markierung, wurden die Blöckchen unter der Stereolupe getrimmt und am Ultramikrotom geschnitten. Nach dem Überführen der 100 nm dünnen Schnitte auf die beschichteten Ni-Grids erfolgte die Immunogold-Markierung für die Elektronenmikroskopie (s. Kap. 2.5.5.6).

In der Abbildung 3.28 erkennt man den Ausschnitt einer Epidermiszelle aus dem jun-





**Abbildung 3.28:** TEM-Aufnahme eines Immunogold-markierten jungen Sprosses von *H. indicum* im Querschnitt. Die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper (1:100,  $OD_{280}=1,11$ ) und dem sekundären, mit 18 nm Goldpartikel konjugierten Antikörper (1:50) erfolgte wie in Kapitel 2.5.5.6 beschrieben. Das Bild zeigt den Ausschnitt einer markierten Epidermiszelle. **CU**-Cuticula, **EP**-Epidermiszelle, **EX**-Extrazellularraum, **ZW**-Zellwand. Der eingezeichnete Balken entspricht einer Länge von 0,5  $\mu\text{m}$ .

gen Sproß von *H. indicum*. Rechts im Bild ist eine weitere, angrenzende Epidermiszelle zu sehen. Nach der Inkubation mit dem spezifischen Antikörper und der Detektion mit dem sekundären Gold-Antikörper konnte die HSS eindeutig im Cytosol der Epidermis lokalisiert werden. Eine genaue Auszählung der Goldpartikel in verschiedenen zufällig gewählten Ausschnitten (s. Tabelle 3.1) ergab, daß die Zellen der Epidermis im Durchschnitt 10x mehr Partikel enthielten als die Zellen des Kollenchyms, die eine mit dem extrazellulären Bereich vergleichbare Anzahl an Nuggets aufwiesen. Eine Expression der HSS in den an die Epidermis angrenzenden Kollenchymzellen konnte somit auf subzellularer Ebene nicht bestätigt werden. Die Anzahl der in ihnen gefundenen Goldpartikel ist gleichauf mit den unspezifischen Ablagerungen des sekundären Antikörpers im extrazellulären Bereich.

Die HSS liegt also auch in den Epidermiszellen des Sprosses von *H. indicum* gelöst im Cytosol vor, was zu den Ergebnissen früherer Untersuchungen passt. Auf eine zusätzliche Untersuchung der jungen Blätter von *H. indicum* durch Elektronenmikroskopie wurde verzichtet, da sich in den Versuchen zur Immunlokalisation gezeigt hat, dass die HSS ebenfalls in der Epidermis exprimiert wird und somit eine weitere subzelluläre Lokalisation keine neuen Erkenntnisse gebracht hätte.

| Zählung | Epidermis | Kollenchym | Extrazellulär |
|---------|-----------|------------|---------------|
| 01      | 34        | 02         | 03            |
| 02      | 30        | 02         | 03            |
| 03      | 29        | 02         | 02            |

**Tabelle 3.1: Ergebnis der Auszählung der Goldpartikel in jeweils drei zufällig gewählten Sichtfeldern unter dem Elektronenmikroskop.** Für jeden Durchgang wurden drei zufällige Sichtfelder ausgezählt: Ein Feld im Bereich der Epidermis, ein Feld im Bereich des darunter liegenden Kollenchyms und ein Feld außerhalb des pflanzlichen Gewebes. Dabei konnte in der Epidermis eine im Durchschnitt um den Faktor 10 höhere Anzahl an Goldpartikel gezählt werden als im Bereich außerhalb des Gewebes. Die Anzahl der Nuggets in den Zellen des unter der Epidermis liegenden Kollenchyms war identisch mit den unspezifischen Ablagerungen im extrazellulären Bereich.

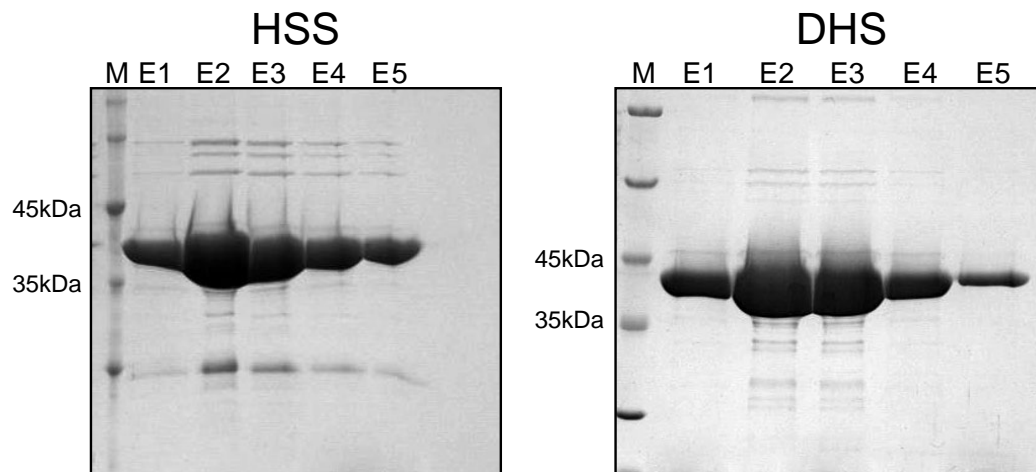
### 3.4 Gewebespezifische Expression der HSS in *Senecio jacobaea*

Nach der gewebespezifischen Lokalisation der HSS in drei verschiedenen Vertretern aus der Familie der Boraginaceae sollte nun mit *S. jacobaea* vergleichend ein Vertreter aus der Familie der Asteraceae (Tribus Senecioneae) untersucht werden. In früheren Untersuchungen konnten Moll (2002) und Anke (2004) zeigen, daß die HSS für den Tribus der Senecioneae und für den Tribus der Eupatorieae innerhalb der Asteraceae auf gewebespezifischer Ebene unterschiedlich exprimiert wird. Während in der Wurzel von *S. vernalis* eine Markierung in isolierten Zellgruppen, zu denen Zellen der Endodermis und des angrenzenden Rindenparenchyms gehören, beobachtet wurde, war die Expression der HSS in den jungen, weißen Wurzeln von *E. cannabinum* auf das gesamte Rindenparenchym ohne Beteiligung der Endodermis ausgedehnt (Moll et al., 2002; Anke et al., 2004). Mit *S. jacobaea* stand somit ein weiterer Vertreter aus der Gattungsgruppe der Senecioneae für vergleichende Expressionsanalysen zur Verfügung. Von besonderem Interesse war die Frage, ob und wie weit sich *S. vernalis* und *S. jacobaea* hinsichtlich des Expressionsmusters der HSS gleichen, da die HSS innerhalb dieser Gattungsgruppe einen monophyletischen Ursprung aufweist.

#### 3.4.1 Reinigung der rekombinanten HSS und DHS aus *Senecio jacobaea*

Die jeweils mit einem 6x His-Tag klonierten HSS und DHS aus *S. jacobaea* wurden bereits in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert und lagen zu Beginn dieser Arbeit in Form von Dauerkulturen vor. Beide Klone wurden parallel wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben für die Expression der HSS respektive DHS angezogen und in einem Schritt metallaffinitätschromatographisch unter Benutzung der Ni-NTA-Agarose (s. Kap. 2.4.4.2) bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt (Abb. 3.29).

Die so gewonnene HSS wurde für die Herstellung eines spezifischen, polyklonalen Antikörpers sowie für anschließende Untersuchungen zur Spezifität eingesetzt. Die gereinigte, rekombinante DHS hingegen diente der Überprüfung der Kreuzreaktivität des HSS-Antikörpers mit der DHS.



**Abbildung 3.29:** Aufreinigung der rekombinanten HSS und DHS aus *S. jacobaea*. Gezeigt werden die Coomassie-gefärbten SDS-Gele (s. Kap. 2.4.3.1) nach der metallaffinitätschromatographischen Aufreinigung. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der Elutionsfraktionen (E1-E5). M= 14,4-116 kDa Proteinleiter (Fermentas)

### 3.4.2 Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die DHS im Western Blot

Auch für *S. jacobaea* wurde eine mögliche Kreuzreaktion des gereinigten HSS-Antikörpers mit der DHS im Vorfeld der gewebespezifischen Lokalisation überprüft. Dazu wurden wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben verschiedene Konzentrationen der rekombinanten HSS und DHS eingesetzt. Im Anschluß an den Immunblot wurde mit dem spezifischen Antikörper gegen die HSS und mit einem sekundären Antikörper, der mit einer Peroxidase konjugiert war, inkubiert und mit dem ECL-Kit detektiert (s. Kap. 2.5.3).

Auf der mit dem ECL-Kit detektierten Membran (Abb. 3.30) erkennt man, daß die HSS bis zu einer Konzentration von 2,5 ng und die DHS bis zu einer Konzentration von 10 ng erkannt wurde, wobei die Bande der HSS bei 2,5 ng jedoch deutlich schwächer als die Bande der DHS bei 10 ng ist. Die Spezifität des gereinigten HSS-Antikörpers war somit etwas geringer als bei den zuvor untersuchten Vertretern aus der Familie der Boraginaceae, was jedoch u.a. darauf zurückzuführen ist, daß die Identität von HSS und DHS aus *S. jacobaea* mit 81 % auf Aminosäureebene höher ist als z.B. bei *C. officinale* (74 % auf Aminosäureebene). Dennoch zeigt der Immunoblot deutlich, daß die HSS im Bereich geringer Konzentration empfindlicher als die DHS vom spezifischen HSS-

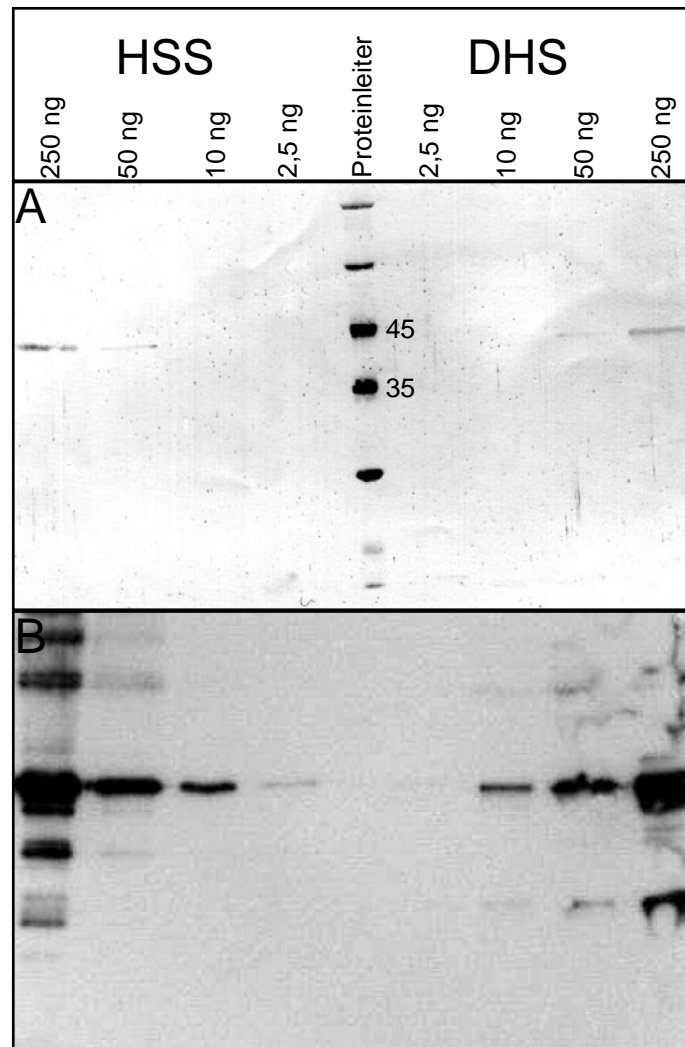
Antikörper detektiert wurde.

Da falsch positive Signale in der gewebespezifischen Lokalisation auf Grund von Kreuzreaktivität mit der DHS nicht ausgeschlossen werden konnten, wurden wie zuvor bei den Boraginaceen weitere Versuche durchgeführt, um die Spezifität der Markierung zu beweisen (s. Kap. 3.4.2).

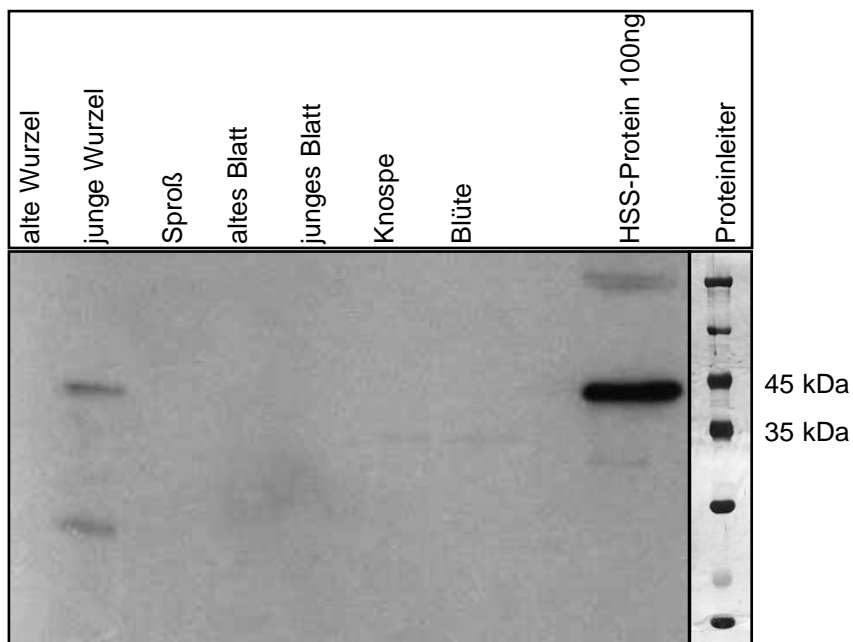
### 3.4.3 Expressionsanalyse durch Western Blot

Um die Ergebnisse mit den vorliegenden Daten von *S. vernalis* vergleichen zu können, wurden für den folgenden Western Blot die gleichen Gewebe ausgewählt, die in früheren Untersuchungen von Moll et al. (2002) analysiert wurden. In *S. vernalis* konnte die Wurzel als exklusives Organ der Expression der HSS identifiziert werden (Moll et al., 2002). Da es sich bei der mir zur Verfügung stehenden Pflanze *S. jacobaea* um eine im Vergleich zum einjährigen Kraut *S. vernalis* mehrjährige Staude handelte, wurde die Wurzel noch einmal untergliedert in die jungen, weißen und jährlich frisch gebildeten Wurzeln und die alten, braunen Wurzeln des Vorjahres. Ergebnisse von anderen mehrjährigen Pflanzen, wie z.B. *E. cannabinum*, haben in der Vergangenheit signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur PA-Biosynthese in unterschiedlich alten Wurzeln aufgezeigt. Im genannten Beispiel *E. cannabinum* zeigten nur die jährlich neu ausgebildeten, weißen Wurzeln eine HSS-Expression (Anke et al., 2004).

Wie in Abbildung 3.31 zu erkennen ist, wurde das HSS-spezifische Signal bei 44 kDa in *S. jacobaea* ebenfalls nur in der jungen Wurzel nachgewiesen. Die alte Wurzel sowie alle übrigen untersuchten Organe enthielten keine nachweisbare HSS. Wie für *S. vernalis* konnte somit auch für *S. jacobaea* die Wurzel als alleiniger Ort der PA-Biosynthese identifiziert werden. Die darüber hinaus beobachtete Beschränkung der HSS-Expression auf die jungen, jährlich neu austreibenden Wurzeln deckte sich dabei mit den von Anke et al. (2004) ermittelten Daten von der ebenfalls mehrjährigen Staude *E. cannabinum*. Zur Klärung der Frage ob die Expression der HSS auf zellulärer Ebene analog dem bereits bekannten Muster von *S. vernalis* organisiert ist oder aber davon abweicht, wurden junge, weiße Wurzeln in den Kunststoff Technovit 7100 (s. Kap. 2.5.5.2) eingebettet und mikroskopisch nach Inkubation mit dem spezifischen HSS-Antikörper untersucht (s. Kap. 3.4.4).



**Abbildung 3.30:** Spezifitätsanalyse des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers gegen die HSS und DHS aus *S. jacobaea* im Western Blot. Jeweils gleiche Mengen von HSS und DHS wurden im SDS-Gel (s. Kap. 2.4.2) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. Kap. 2.5.3). Die PVDF-Membran wurde nacheinander mit dem spezifischen HSS Antikörper ( $OD_{280}=1,83$ ) in einer 1:10000 Verdünnung und dem sekundären Antikörper (1:3300) inkubiert und anschließend mit dem ECL-Kit detektiert. (B). Im Anschluß daran wurde die Membran mit Indian-Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt (A). Zur Identifizierung der Banden wurde zusätzlich ein 14,4-116 kDa Proteinmarker (Fermentas) aufgetragen.



**Abbildung 3.31: Western Blot verschiedener Gewebe von *S. jacobaea*.** Jeweils 20 µg isoliertes Gesamtprotein aus den jeweiligen Geweben wurden im SDS-Gel (s. Kap. 2.4.2) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. Kap. 2.5.3). Im Anschluß an die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:10000, OD<sub>280</sub>=1,83) und dem sekundären Antikörper (1:3300) erfolgte die Detektion mit dem ECL-Kit. Der 14,4-116 kDa Größenmarker (Fermentas) wurde nach dem Blotten von der Membran abgetrennt und mit Indian Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt, um die Größe der Banden abschätzen zu können.

#### 3.4.4 Immunolokalisation der HSS auf zellulärer Ebene in den Wurzeln von *Senecio jacobaea*

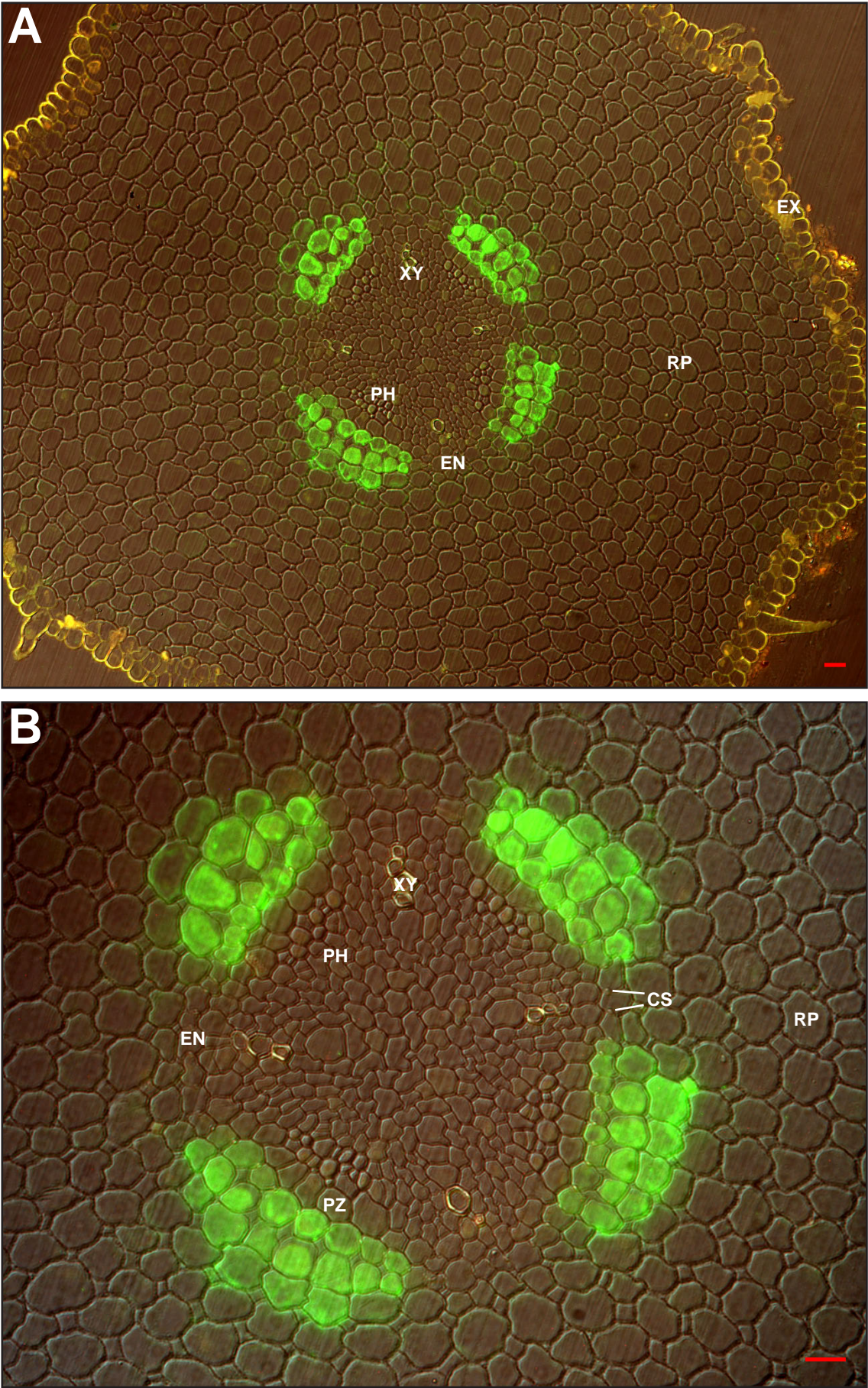
Nachdem sich im Western Blot gezeigt hatte, daß die HSS ausschließlich in den jungen, jährlich neu austreibenden Wurzeln von *S. jacobaea* gebildet wird, konnte gezielt mit der Einbettung in den Kunststoff Technovit 7100 (s. Kap. 2.5.5.2) begonnen werden. Die eingebetteten ca. 1 cm langen Wurzelsegmente wurden am Mikrotom geschnitten, mit dem spezifischen Antikörper inkubiert und zunächst mit AlexaFluor®488 detektiert. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Segmente mindestens 1 cm Abstand zur Wurzelspitze aufwiesen, da frühere Untersuchungen von Moll (2002) und Anke (2004) gezeigt haben, daß die HSS erst im Anschluß an die Zellteilungs- und Zellstreckungszone in der Differenzierungszone exprimiert wird. Diese Beobachtung wurde auch bereits im Rahmen dieser Arbeit bei *C. officinale* gemacht (s. Kap. 3.1.4).

In Abbildung 3.32 A erkennt man den Querschnitt durch eine junge Wurzel von *Senecio jacobaea* mit einem tetrarchen Leitbündel. Die vier noch nicht vollständig ausdifferenzierten Xylemstrahlen zeigten bei der eingesetzten Wellenlänge von 495 nm wie auch die Exodermis eine gelbe, durch Lignineinlagerungen verursachte Autofluoreszenz, die sich jedoch deutlich von der grünen Fluoreszenz des eingesetzten Farbstoffs unterschied. Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper zeigten Zellverbände der Endodermis sowie 2-3 Zellschichten der direkt angrenzenden Parenchymzellen eine Markierung. Die markierten Zellen der Endodermis und des angrenzenden Rindenparenchyms bildeten jeweils vier distinkte Zellgruppen, die dem Phloem gegenüber liegen. Im Bereich des Xylems war keine Markierung der Zellen zu beobachten.

Die Vergrößerung (Abb. 3.32 B) belegt nochmals deutlich, daß die Zellen des Perizykels nicht markiert wurden, da die Endodermis unter dem Fluoreszenzmikroskop eindeutig an der gelben Autofluoreszenz des Casparyschen Streifens identifiziert werden konnte.

Die gleichen Resultate wurden reproduzierbar auch nach Inkubation der Schnitte mit Immunogold (s. Kap. 2.5.5.6) und anschließender Signalverstärkung mit Silver-Enhancement erhalten. Dazu wurden die gleichen in Technovit 7100 eingebetteten Proben eingesetzt, wie zuvor für die AlexaFluor®488-Markierung. Bei der mikroskopischen Auswertung unter Einsatz des Dunkelfeldkondensors (Abb. 3.33 A) erkannte man die goldene Markierung in den oben bereits erwähnten isolierten Zellverbänden, bestehend aus Endodermis und angrenzenden Parenchymzellen direkt gegenüber dem Phloem. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zur Mikroskopie im Hellfeld lag im höheren Kontrast der



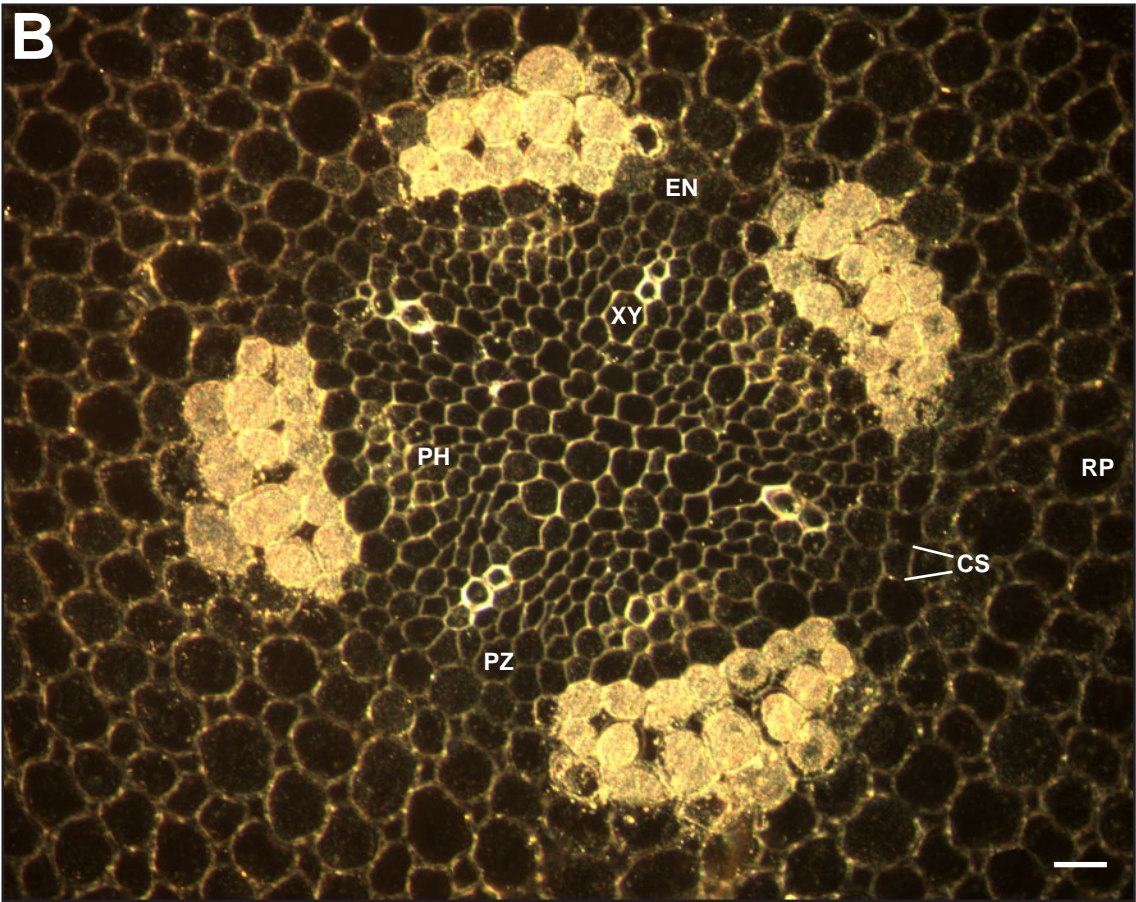
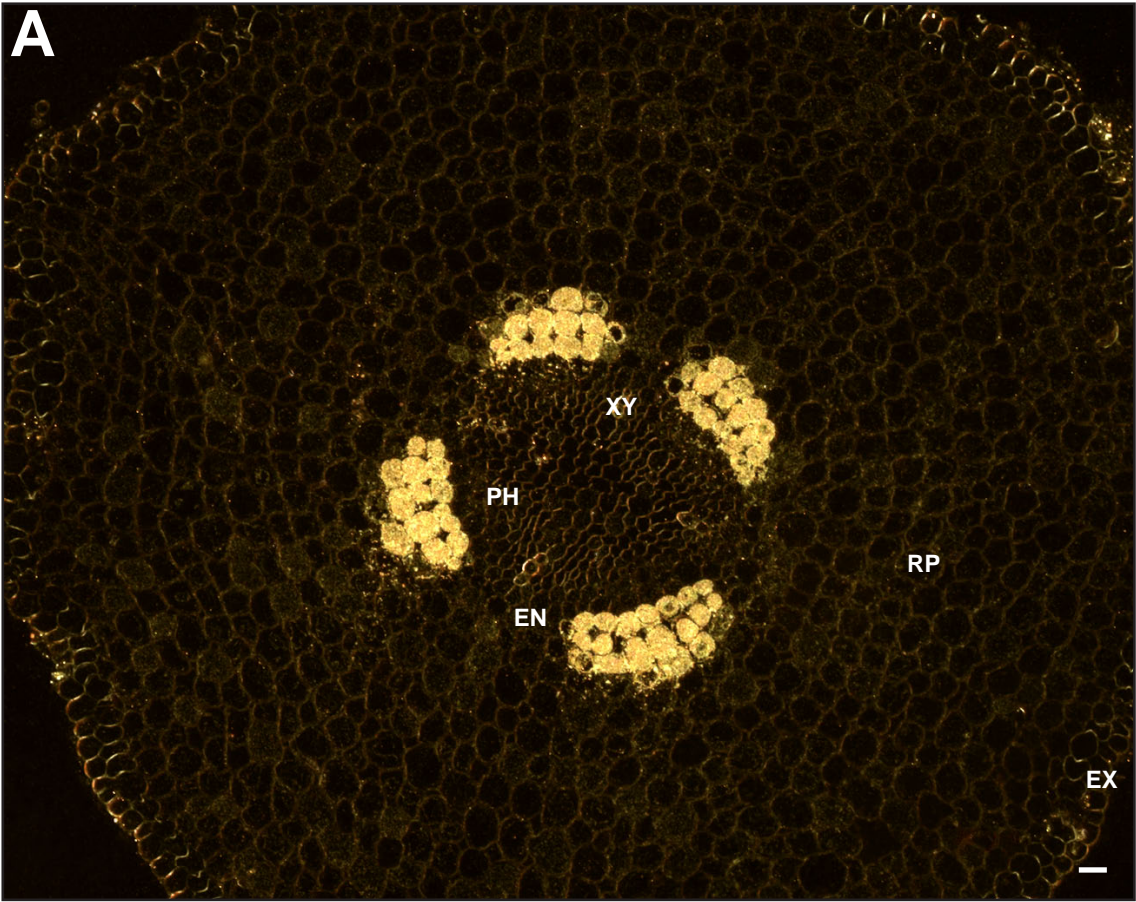


**Abbildung 3.32:** (s. vorherige Seite) AlexaFluor®488-markierter Querschnitt durch die Wurzel von *S. jacobaea* in der Übersicht und im Detail. Der 3 µm dicke Querschnitt wurde nacheinander mit dem spezifischen HSS-Antikörper ( $OD_{280}=1,83$ ) in einer 1:100 Verdünnung und dem sekundären AlexaFluor®488-Antikörper in einer 1:100 Verdünnung inkubiert. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben. In Bild **A** erkennt man das tetrarche Leitbündel der Wurzel. Eine spezifische Markierung zeigten 4 isolierte Zellgruppen bestehend aus Zellen der Endodermis sowie des angrenzenden Rindenparenchyms. Die Exodermis der Wurzel, sowie die Xylemstrahlen und der Caspary-Streifen zeigen eine gelbe Autofluoreszenz. Die Abbildung **B** zeigt eine Vergrößerung von A. In dieser Detailaufnahme erkennt man deutlich die Autofluoreszenz des Caspary-Streifen innerhalb der Endodermis. Die daran nach innen angrenzenden Zellen des Perizykels waren nicht markiert. **CS**-Casparyscher Streifen, **EN**-Endodermis, **PH**-Phloem, **PZ**-Perizykel, **RP**-Rindenparenchym, **XY**-Xylem. Der eingefügte Größenmarker entspricht in beiden Abbildungen einer Länge von 10 µm.

goldfarbenen Markierung gegenüber den nicht markierten Zellen. In der Vergrößerung (Abb. 3.33 B) erkennt man, daß die Zellen des Perizykels nicht markiert wurden, wobei der im Dunkelfeld aufleuchtende Caspary-Streifen zur eindeutigen Identifizierung der Endodermis herangezogen werden konnte.

Somit zeigte die HSS in *S. jacobaea* auf zellulärer Ebene das gleiche Expressionsmuster wie *S. vernalis*. In beiden Pflanzen konnte die HSS gewebespezifisch in isolierten Zellgruppen aus Endodermis und angrenzenden Parenchymzellen lokalisiert werden. Diese Zellgruppen befinden sich direkt gegenüber dem Phloem, was für einen weiteren Transport der PAs innerhalb der gesamten Pflanze von Vorteil ist. Versuche an der PA-produzierenden Pflanze *S. vulgaris* in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß die PAs über das Phloem in der Pflanze transportiert werden (Hartmann et al., 1989). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß *S. jacobaea* und *S. vernalis* ein identisches Expressionsmuster aufweisen, obwohl die Wurzeln im Fall von *S. jacobaea* über ein tetrarches und im Fall von *S. vernalis* über ein triarches Leitbündel verfügen. Somit scheint die gewebespezifische Expression der HSS zumindest für den Tribus der Senecioeae innerhalb der Familie der Asteraceae gleichartig reguliert zu sein. *E. cannabinum*, eine weitere Asteraceae (Tribus Eupatorieae), zeigte hingegen mit der Markierung des gesamten Rindenparenchyms in der jungen Wurzel ein gänzlich anderes Expressionsmuster (Anke et al., 2004). Dies kann jedoch darauf zurückgeführt werden, daß *E. cannabinum* einem anderen Tribus innerhalb der Asteraceae angehört. Für die beiden Triben inner-



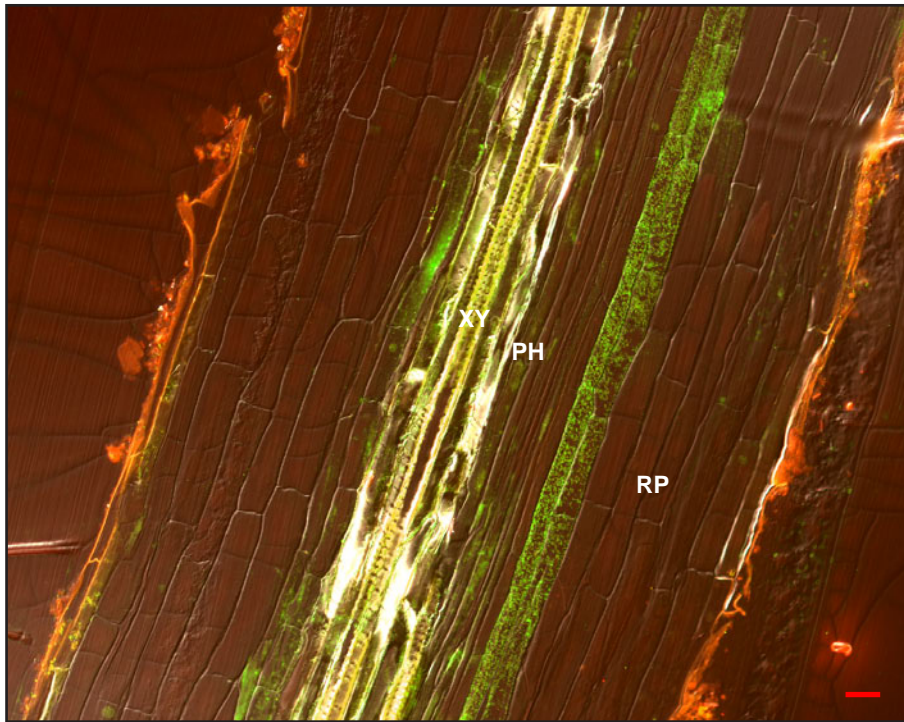


**Abbildung 3.33:** (s. vorherige Seite) Immunogold-markierter Querschnitt durch die Wurzel von *S. jacobaea* in der Übersicht und im Detail. Der 3 µm dicke Querschnitt wurde mit dem spezifischen HSS-Antikörper ( $OD_{280}=1,83$ ) in einer 1:100 Verdünnung inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Immunogold-Antikörper (1:100), bevor die Markierung mit dem Silberreagenz sichtbar gemacht wurde. Die Auswertung erfolgte am Dunkelfeldmikroskop. In der Detailaufnahme (**B**) ist deutlich der Casparysche Streifen in den Radiärwänden der Endodermis zu erkennen. **CS**-Casparyscher Streifen, **EN**-Endodermis, **PH**-Phloem, **PZ**-Perizykel, **RP**-Rindenparenchym, **XY**-Xylem. Der eingefügte Größenmarker entspricht in beiden Abbildungen einer Länge von 10 µm.

halb der Familie ist die HSS unabhängig aus der DHS entstanden (Reimann et al., 2004). Bisher wurde auch bei *S. vernalis* die Lokalisation der HSS nur in Querschnitten untersucht. Daher erschien es interessant, die Lokalisation auch mal im Längsschnitt von jungen, weißen Wurzeln zu untersuchen. Dazu wurden wie in Kapitel 2.5.5.2 beschriebenen Wurzelsegmente mit Hilfe einer speziellen Teflonform (Histoform S, Heraeus Kulzer) in den Kunststoff Technovit 7100 eingebettet, mit dem Kunststoff Technovit 3040 aufgeblockt und mit Hilfe eines Kunststoffträgers am Mikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden nacheinander zunächst mit dem spezifischen HSS-Antikörper in einer 1:100 Verdünnung ( $OD_{280}=1,83$ ) und anschließend mit dem AlexaFluor<sup>®</sup>488 gekoppelten sekundären Antikörper in einer 1:100 Verdünnung inkubiert.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abb. 3.34) erkennt man die starke gelbe Autofluoreszenz des Xylems unter der Anregungswellenlänge von 495 nm. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden 2 Zellreihen des Rindenparenchyms durchgängig markiert. Die Expression der HSS erfolgt in der Wurzel somit durchgängig wie in einer Art Röhrensystem durch die beteiligten Zellen. Dabei zeigten die markierten Zellen keine auffälligen anatomischen Besonderheiten im Vergleich zu den sie umgebenden, nicht markierten Zellen des Rindenparenchyms. Eine Untersuchung unter dem TEM zur genauen Aufklärung möglicher anatomischer Besonderheiten wie z.B. einer erhöhten Zahl von Plasmodesmen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt. Frühere Untersuchungen am Querschnitt der jungen Wurzel von *S. vernalis* zeigten kein vermehrtes Vorkommen von Plasmodesmen, um mögliche Intermediate und PAs zwischen den Zellen zu transportieren (Moll et al., 2002).





**Abbildung 3.34:** Längsschnitt durch die Wurzel von *S. jacobaea*. Die Inkubation der 3  $\mu\text{m}$  dicken Schnitte erfolgte wie in Abbildung 3.32 beschrieben. Gut zu erkennen ist die starke gelbe Autofluoreszenz des Xylemstrahls. Eine spezifische Markierung findet sich in zwei aufeinander folgenden Zellreihen des Rindenparenchyms. **PH**- Phloem, **RP**- Rindenparenchym, **XY**- Xylem. Der eingezeichnete Balken entspricht einer Länge von 10  $\mu\text{m}$ .

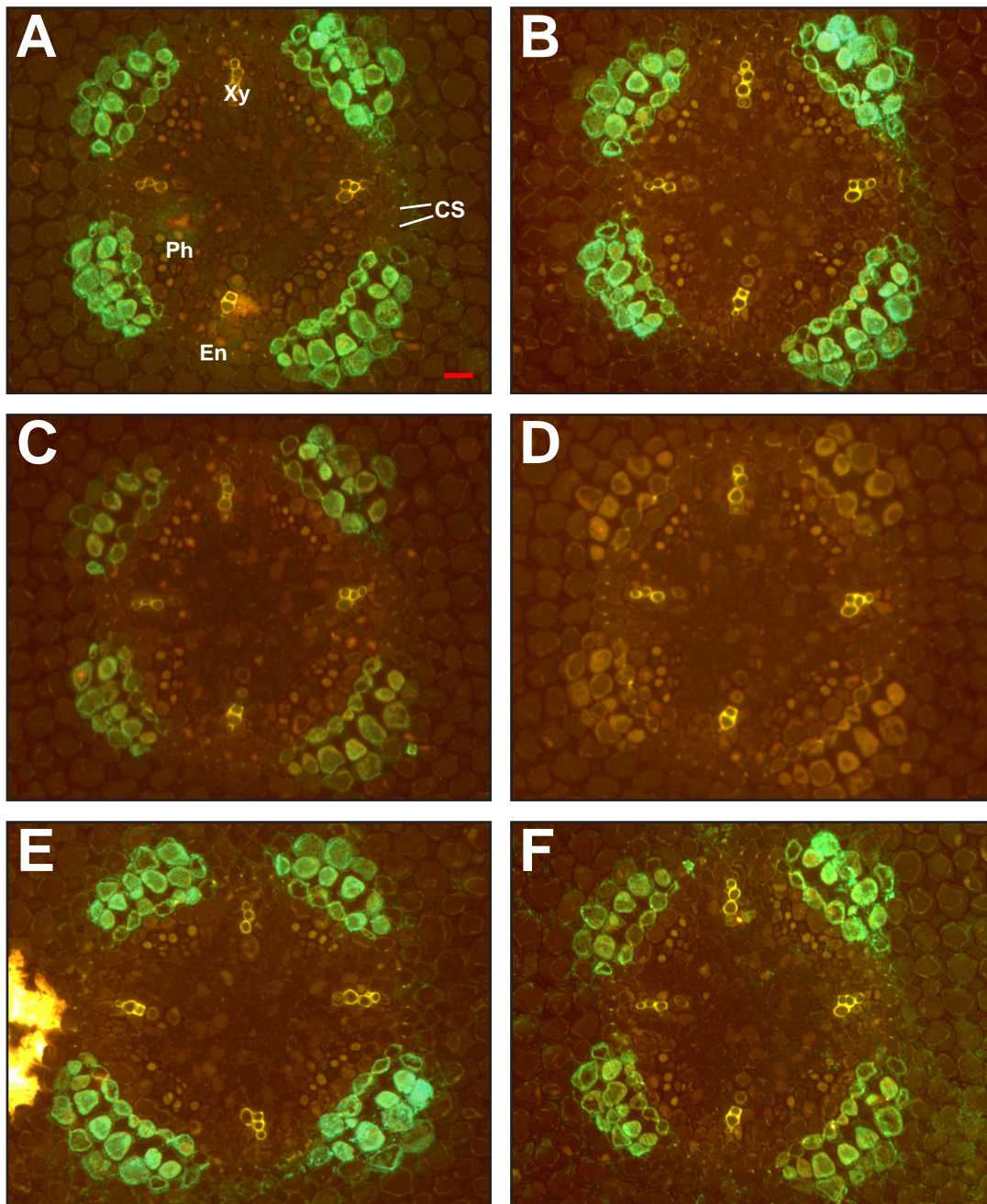
### 3.4.5 Kontrollversuche zur Spezifität der Markierung

Der spezifische, affinitätsgereinigte HSS-Antikörper zeigte im Western Blot, wie bereits bei den parallel untersuchten Vertretern aus der Familie der Boraginaceae beobachtet, eine merkliche Kreuzreaktivität zur rekombinant gewonnenen DHS (s. Kap. 3.4.2). Aus diesem Grund wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um die Spezifität der gewebespezifischen Immunlokalisation der HSS zu belegen. Die Durchführung erfolgte dabei wie in Kapitel 3.1.4.1 exemplarisch am Beispiel *C. officinale* beschrieben.

Nach Inkubation der Schnitte mit 1x PBS an Stelle des spezifischen Antikörpers konnte keine Immunantwort detektiert werden, womit eine unspezifische Reaktion des sekundären Antikörpers mit dem pflanzlichen Gewebe ausgeschlossen werden konnte. Eine im Vorfeld durchgeführte Inkubation des spezifischen Antikörpers mit einem dreifachen Überschuß an HSS-Protein im Verhältnis zur IgG-Konzentration ergab eine Auslöschung der Markierung, eine Vorinkubation mit nur einem Zehntel an HSS-Protein führte zu einer signifikanten Abschwächung des Signals (Abb. 3.35 C und D). Wurde die Unterfütterung mit DHS-Protein anstatt HSS-Protein in gleicher Art und Weise durchgeführt, konnte keine Veränderung der Markierung hinsichtlich Intensität im Vergleich zur Inkubation mit dem spezifischen Antikörper ohne vorherige Inkubation beobachtet werden (Abb. 3.35 E und F). Ein wesentlicher Einfluß der DHS durch Kreuzreaktivität des Antikörpers auf diese Markierung kann somit ausgeschlossen werden. Eine Reaktion des spezifischen HSS-Antikörpers mit Fremdprotein konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da eine Inkubation mit dem dreifachen Überschuß an BSA-Protein zu keiner sichtbaren Abschwächung des Signals führte (Abb. 3.35 B). Der gereinigte HSS-Antikörper hatte also die HSS im Gewebe spezifisch in spezialisierten Zellen der Endodermis und des angrenzenden Rindenparenchyms in der jungen Wurzel von *S. jacobaea* erkannt (Abb. 3.32 und 3.33).

### 3.4.6 Proteolytische Spaltung der HSS als Artefakt bei Western Blots

Bei der Auswertung der durchgeführten Immunoblots wurde häufig beobachtet, daß für die HSS an Stelle einer einzelnen Bande bei 44 kDa zusätzliche Banden bei ca. 18 kDa und ca. 26 kDa auftraten. Dies war z.B. bei der Untersuchung einer Wurzelprobe aus *C. officinale* im Western Blot mit dem HSS-spezifischen Antikörper der Fall (s. Abb. 3.3). Zum Teil trat auch nur vereinzelt die Bande bei 26 kDa ohne die beiden anderen Signale auf. Diese Beobachtung wurde in der alten Wurzel von *S. officinale* gemacht (s. Abb. 3.13).



**Abbildung 3.35:** Ausschnitte von FITC-markierten Blattquerschnitten (Schnittdicke  $3\ \mu\text{m}$ ) von *S. jacobaea* aus den Kontrollversuchen zur Spezifität der Markierung. Die Vorinkubierung des Antikörpers und die anschließende Detektion erfolgten wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben. **CS**-Casparyscher Streifen, **En**-Endodermis, **Ph**-Phloem, **Xy**-Xylem,. Detektiert wurde nach Inkubation mit dem HSS-Antikörper ohne Unterfütterung (**A**) sowie nach Vorinkubation mit jeweils einem Zehntel bzw. einem dreifachen Überschuß an HSS (**C und D**) und DHS (**E und F**) Protein. Zusätzlich wurde mit einem dreifachen Überschuß an BSA-Protein (**B**) unterfüttert. Der eingefügte Größenmarker entspricht einer Länge von  $10\ \mu\text{m}$ .

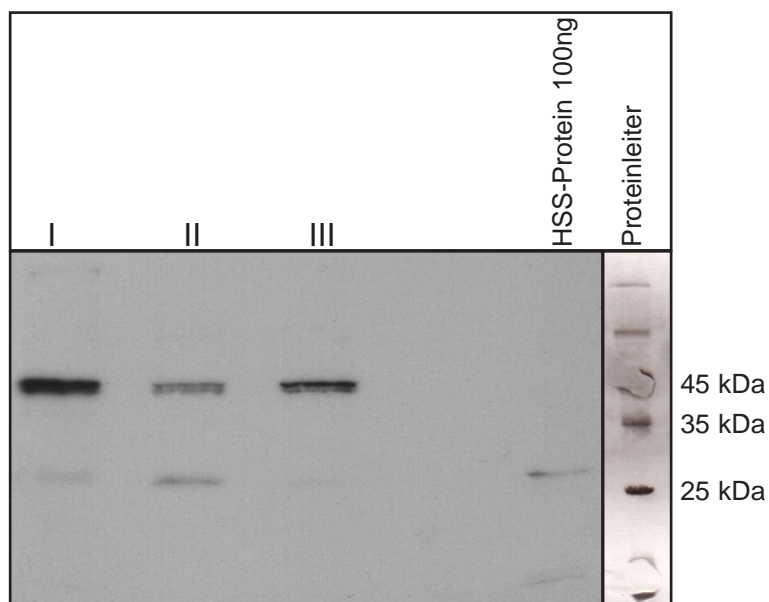
Dieses Bandenmuster trat auch bei Wiederholungen reproduzierbar auf. Eine unspezifische Reaktion des HSS-Antikörpers konnte durch die für alle Pflanzen durchgeführten Kontrollversuche zur Spezifität der jeweiligen Markierung (s. Kap. 3.1.4.1, 3.2.5.1, 3.3.5, 3.3.7 und 3.4.2) ausgeschlossen werden. Daß die Addition der beiden kleineren Fragmente bei 18 kDa und 26 kDa wieder die ursprüngliche Größe der HSS von 44 kDa ergab, legte den Schluß nahe, daß es sich bei den beiden kleineren Fragmenten möglicherweise um Abbauprodukte der HSS handeln könnte. Dieser Abbau könnte zum einen aus der Pflanze selbst, z.B. als Folge einer Umstellung des pflanzlichen Stoffwechsels nach dem Abschneiden der Pflanze resultieren oder aber ein durch eine Verunreinigung mit einer Protease künstlich erzeugtes Artefakt sein. Da die bestehenden Daten keine Anzeichen für einen Abbau der HSS in der Pflanze liefern, wurde zunächst in verschiedenen Kontrollversuchen überprüft, ob eine externe Verunreinigung mit einer Protease vorlag. Eine erste Untersuchung der für die Extraktion des löslichen Gesamtproteins (s. Kap. 2.5.3.1) benötigten Chemikalien ergab keine Anzeichen einer Verunreinigung.

Die Tatsache, daß diese Abbaubanden nicht bei der Untersuchung der oberirdischen Organe von *H. indicum* im Western Blot (s. Abb. 3.21) auftraten, rückte die den Wurzelproben anhaftende Erde als mögliche Quelle einer Kontaminierung in den Vordergrund. Bei der Probenaufarbeitung war es häufig auf Grund der zum Teil sehr feinen Wurzeln nicht immer möglich, die anhaftende Erde quantitativ abzuwaschen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Wurzelorgankulturen von *S. jacobaea* eingesetzt, die bereits vor Beginn dieser Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurden. Damit standen mir für die weiteren Untersuchungen Wurzeln zur Verfügung, die unter sterilen Bedingungen und ohne jeglichen Kontakt zu Erde kultiviert worden sind.

Um einen Abbau der HSS durch Proteasen aus der Erde im Western Blot nachzuweisen, wurde der Ansatz dreigeteilt: Ein Teil der Wurzeln aus der Sterilkultur wurde wie in Kapitel 2.5.3.1 beschrieben nach dem Standardverfahren aufgearbeitet. Bei der Isolierung des Gesamtproteins aus dem zweiten Teil der Wurzeln wurde dem Extraktionspuffer zusätzlich Erde aus dem Wurzelbereich der im Garten kultivierten *S. jacobaea* Pflanzen zugesetzt. Dem dritten Ansatz wurde zusätzlich zur Erde ein Proteaseinhibitor mit breitem Wirkspektrum zugesetzt. Dabei handelte es sich um Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), welches in einer Endkonzentration von 0,2 mM im Extraktionspuffer eingesetzt wurde. 20 µg Protein wurden jeweils gefällt, im SDS-Gel aufgetrennt (s. Kap. 2.4.2) und im Western Blot (s. Kap. 2.5.3) untersucht.

Auf der mit dem spezifischen Antikörper inkubierten Membran (Abb. 3.36) zeigte die





**Abbildung 3.36: Western Blot zur Untersuchung eines Abbaus der HSS von *S. jacobaea*.** Jeweils 20 µg isoliertes Gesamtprotein aus den verschiedenen Aufarbeitungen der Wurzelorgankultur wurde im SDS-Gel (s. Kap. 2.4.2) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. Kap. 2.5.3). Im Anschluß an die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:10000, OD<sub>280</sub>=1,83) und dem sekundären Antikörper (1:3300) erfolgte die Detektion mit dem ECL-Kit. Der 14,4-116 kDa Proteinmarker (Fermentas) wurde nach dem Blotten von der Membran abgetrennt und mit Indian Ink (s. Kap. 2.4.3.2) angefärbt, um die Größe der Banden abschätzen zu können. **I**- Isolierung des löslichen Gesamtprotein nach Standardprotokoll, **II**-wie I jedoch zusätzlich mit Erde im Extraktinspuffer, **III**-wie II jedoch zusätzlich mit einem Proteinaseinhibitor.

nach Standardprotokoll isolierte Probe der Wurzelorgankultur ein deutliches Signal der HSS bei 44 kDa (Spur 1). Zeichen für einen Abbau waren nicht ersichtlich. Nach Zusatz der Erde zum Extraktionspuffer trat im Western Blot ein weiteres Signal bei 26 kDa als Zeichen eines Abbaus auf (Spur 2). Diese zusätzliche Bande trat nicht auf, wenn dem Extraktionspuffer neben der Erde auch noch ein Proteaseinhibitor zugesetzt wurde (Spur 3). Mit diesem Western Blot konnte also belegt werden, daß eine hemmbare Protease für den Abbau der HSS verantwortlich war, die höchstwahrscheinlich über die den Wurzeln anhaftende Erde eingeschleppt worden war. Da diese Ergebnisse jedoch erst zum Ende der Arbeit vorlagen, konnte eine Wiederholung der Western Blots sämtlicher untersuchter Pflanzen nicht mehr durchgeführt werden. Auf die Durchführung konnte auch darüber hinaus verzichtet werden, da der gereinigte HSS-Antikörper auch die Abbaufragmente der HSS im Western Blot erkannt hatte, eine Wiederholung unter Zusatz eines Proteinasehemmstoffs also keine neuen Erkenntnisse erbracht hätte.

## 4 Diskussion

Eine bereits in der Einleitung beschriebene Eigenschaft des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels ist die große Vielfalt hinsichtlich der chemischen Struktur und Funktionalität seiner Produkte: In Form von Farbstoffen, Aromen oder chemischen Abwehrstoffen sind sie für die sie produzierende Pflanze essentiell für ihr Überleben und Fortbestehen in ihrer Umwelt.

Die Gene der für die Biosynthese der Sekundärstoffe benötigten Enzyme sind dabei nach heutiger Annahme häufig im Zuge der Evolution durch Genduplikation aus dem Primärstoffwechsel hervorgegangen. Aber auch bereits im Sekundärstoffwechsel etablierte Gene können ihrerseits wieder für neue Funktionen rekrutiert werden (Pichersky und Gang, 2000). Vor diesem Hintergrund, der Gegenstand heutiger Forschungsarbeit ist und bereits durch einzelne Beispiele belegt werden konnte, stellt die Genduplikation einen wichtigen Mechanismus für die stetige Weiterentwicklung des Sekundärstoffwechsels dar (Ober, 2005). Im Verlauf einer Genduplikation entstehen zunächst zwei identische Genkopien, von denen eine Genkopie dem strengen Selektionsdruck des hochkonservierten Primärstoffwechsels entzogen wird und somit für Mutationen zugänglich ist. Diese Mutationen führen dann in den meisten Fällen zu funktionslosen Pseudogenen. In seltenen Fällen entsteht dabei ein Gen mit einer komplett neuen Funktion, welche dann im Zuge weiterer Mutationen weiter optimiert wird, wenn die Pflanze durch diese neue Funktion einen Selektionsvorteil z.B. in Form eines Fraßschutzes erlangt.

Ein gut untersuchtes Beispiel für einen effektiven Schutz vor Herbivorie durch Sekundärstoffe stellen die PAs dar. Das Eingangsenzym der PA-Biosynthese, die HSS ist das Produkt einer Genduplikation mit einem kompletten Funktionswechsel. Die HSS ist unter dem Selektionsdruck der Herbivorie aus der ubiquitär vorkommenden DHS, einem hochkonservierten Enzym des Primärstoffwechsels rekrutiert worden (Ober und Hartmann, 1999b, 2000). Die dabei entstandene Genkopie verlor die ursprüngliche Hauptaktivität (Aktivierung des eIF5A) des „Muttergens“ und die Nebenaktivität (Aminobutylierung von Putrescin) wurde somit zur Hauptaktivität. Bei der HSS handelt es sich folglich um eine DHS, die ihre ursprüngliche Hauptaktivität verloren hat (Ober et al., 2003b).

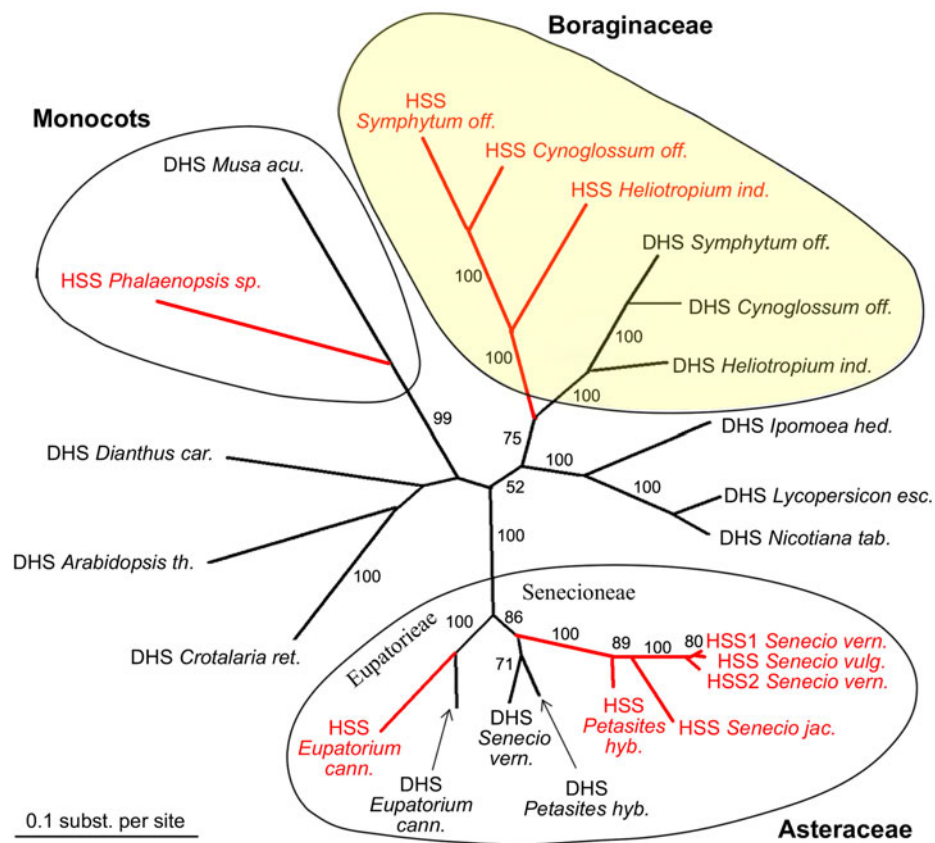
## 4.1 Vergleich der Expressionsmuster der HSS vor dem Hintergrund ihres polyphyletischen Ursprungs innerhalb der Angiospermen

Das verstreute Vorkommen der PAs in nicht nahe miteinander verwandten Pflanzenfamilien innerhalb der Angiospermen warf die Frage nach dem Ursprung der HSS als Eingangsenzym der PA-Biosynthese auf: Ist die HSS mehrfach unabhängig aus der ubiquitären DHS rekrutiert worden (polyphyletischer Ursprung) oder gab es einen gemeinsamen Vorläufer aller heutigen HSS (monophyletischer Ursprung) in Form einer „Ur-HSS“?

Die phylogenetische Analyse aller bisher bekannten cDNAs, die für die DHS und HSS kodieren, ergab mindestens 4 unabhängige Ursprünge der HSS innerhalb der Angiospermen (Reimann et al., 2004). Eine Rekrutierung erfolgte innerhalb der einkeimblättrigen Pflanzen (Abb. 4.1). Innerhalb der Asteraceae konnten mit jeweils einem Ursprung für die Triben der Eupatorieae und der Senecioneae zwei unabhängige Rekrutierungen nachgewiesen werden (Abb. 4.1). Ein vierter Ursprung der HSS wurde für die Familie der Boraginaceae belegt (Abb. 4.1, gelb unterlegt). Ob sich dieser innerhalb der Boraginaceen monophyltische Ursprung der HSS in der zell- und gewebespezifischen Expression widerspiegelt, wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der HSS aus *Cynoglossum officinale*, *Symphytum officinale* und *Heliotropium indicum* exemplarisch untersucht. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit mit *Senecio jacobaea* (Asteraceae) eine weitere Art aus dem Tribus der Senecioneae untersucht. Die dabei erhaltenen Erkenntnisse werden im weiteren Verlauf mit den bereits bekannten Daten zur Expression der HSS in *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae), *Senecio vernalis* (Asteraceae) und *Phalaenopsis spec.* (Orchidaceae) vergleichend diskutiert.

### 4.1.1 Kreuzreaktivität des HSS-Antikörpers mit der DHS

Da die HSS im Verlauf der Evolution aus der DHS durch Genduplikation entstanden und im Anschluß daran für die Produktion von Sekundärstoffen rekrutiert worden ist, ist eine hohe Sequenzidentität zwischen der HSS und der DHS naheliegend. Für die in dieser Arbeit untersuchten Vertreter aus der Familie der Boraginaceae (*C. officinale*, *S. officinale*, *H. indicum*) lag sie mit durchschnittlich 74 % sowohl auf Nuklein- als auch auf Aminosäureebene auf einem relativ hohen Niveau. Für *S. jacobaea* (Asteraceae, Tribus Senecioneae) konnte mit 82,2 % auf Nuklein- und 81,0 % auf Aminosäureebene sogar



**Abbildung 4.1:** „Unrooted Maximum Likelihood Tree“ basierend auf 23 cDNA-Sequenzen, die für die DHS (schwarze Linien) und HSS (rote Linien) von verschiedenen Arten der Angiospermen kodieren (Reimann et al., 2004), modifiziert.

**Abkürzungen:** *Symphytum off.*: *Symphytum officinale*, *Cynoglossum off.*: *Cynoglossum officinale*, *Heliotropium ind.*: *Heliotropium indicum*, *Nicotiana tab.*: *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esc.*: *Lycopersicon esculentum*, *Ipomoea hed.*: *Ipomoea hederifolia*, *Senecio vern.*: *Senecio vernalis*, *Senecio vulg.*: *Senecio vulgaris*, *Senecio jac.*: *Senecio jacobaea*, *Petasitis hyb.*: *Petasitis hybridus*, *Eupatorium cann.*: *Eupatorium cannabinum*, *Crotalaria ret.*: *Crotalaria retusa*, *Arabidopsis th.*: *Arabidopsis thaliana*, *Dianthus car.*: *Dianthus caryophyllus*, *Phalaenopsis sp.*: *Phalaenopsis spec.*, *Musa acu.*: *Musa acuminata*

eine noch höhere Identität beobachtet werden. Daß diese hohe Sequenzidentität zu einer Kreuzreaktivität des spezifischen HSS-Antikörpers mit der DHS führt, war schon bei früheren Studien an *S. vernalis* und *E. cannabinum* in unserer Arbeitsgruppe beobachtet worden und konnte im Western Blot bestätigt werden. In allen vier untersuchten Pflanzen wurde die DHS im Western Blot vom jeweiligen affinitätsgereinigten, polyklonalen HSS-Antikörper erkannt. Dabei wurde, unter der Voraussetzung, daß gleiche Mengen HSS und DHS aufgetragen wurden, im Fall der drei untersuchten Boraginaceen die HSS vom HSS-Antikörper um den Faktor 4 empfindlicher detektiert als die DHS. Für *S. jacobaea* konnte dieser Faktor im Western Blot nicht ganz erreicht werden, dennoch zeigte auch hier der spezifische HSS-Antikörper eine eindeutige Präferenz zur HSS. Ungeachtet dieser Kreuzreaktivität wurde davon Abstand genommen den Antikörper gegen die DHS durch Affinitätschromatographie kreuz zu reinigen, da diese Methode bereits in der Vergangenheit nicht zum Erfolg geführt hat, sondern lediglich die Antigenität des Antikörpers signifikant verschlechterte (Moll, 2002).

Trotz dieser Kreuzreaktivität konnte auf zellulärer Ebene durch *in situ* Unterfütterungsexperimente eindeutig belegt werden, daß der HSS-Antikörper im Gewebe hochspezifisch die HSS erkannte. Jegliche Beeinflussung der Markierung durch die Kreuzreaktion des Antikörpers mit der DHS konnte ausgeschlossen werden. Die gleichen Spezifitätsuntersuchungen haben sich bereits bei der Lokalisation der HSS im Wurzelgewebe von *S. vernalis* (Moll et al., 2002) und *E. cannabinum* (Anke et al., 2004) bewährt.

#### 4.1.2 Abbau der HSS

Bei der Auswertung der durchgeführten Western Blots der unterschiedlichen Gewebe von *C. officinale*, *S. officinale* und *S. jacobaea* fiel in den jeweiligen Wurzelproben das wiederholte Auftreten von drei Banden an Stelle einer erwarteten Bande bei 44 kDa auf. Zusätzlich zu der bekannten Bande für die HSS konnten noch zwei weitere Signale bei ca. 18 kDa und ca. 26 kDa beobachtet werden. Dieses charakteristische Bandenmuster trat in verschiedenen Wurzelextrakten reproduzierbar auf. Gelegentlich konnte jedoch nur die zweite Bande bei 26 kDa gefunden werden, was aber darauf zurückgeführt werden kann, daß das kleinere Fragment bereits aus dem Gel gelaufen war. Diese Beobachtungen ließen eine unspezifische Reaktion des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers mit Fremdprotein unwahrscheinlich erscheinen. Ebenso konnte eine nicht spezifische Anlagerung des sekundären Antikörpers ausgeschlossen werden, da nach der Inkubation mit 1x PBS an

Stelle des primären, spezifischen HSS-Antikörpers kein Signal detektiert werden konnte. Vielmehr schien es sich bei den beiden kleineren Banden um Abbauprodukte der HSS zu handeln, da die Addition der beiden Signale wieder die ursprünglichen 44 kDa der HSS ergab.

Zunächst lag die Vermutung nahe, daß es sich bei diesem Abbau um eine von der Pflanze selbst regulierte Inaktivierung der HSS handelt, da die drei Banden zunächst vor allem in Proteinextrakten von alten Wurzeln dokumentiert wurden. Denkbar wäre zum Beispiel eine Inaktivierung in Abhängigkeit von der Jahreszeit wobei in den alten Wurzeln zum Ende der Vegetationsperiode nicht nur ein Abschalten der Expression der HSS erfolgt, sondern die noch vorhandene HSS zusätzlich inaktiviert wird. Eine Regulation in Abhängigkeit von der Jahreszeit konnte schon für die mehrjährige Staude *E. cannabinum* nachgewiesen werden (Anke et al., 2004). Nach dem Aufblühen der Knospen konnte im Western Blot eine Abnahme der HSS beobachtet werden, bis schließlich mit Ausbildung der Frucht gar keine HSS mehr in der Wurzel detektiert werden konnte (Anke et al., 2004). Erst die neuen, weißen Wurzeln im Folgejahr zeigten wieder eine Expression der HSS, die mit Ausbildung der Knospen ihr Maximum erreichte. Bei Untersuchung der einjährigen Pflanze *S. vernalis* konnte diese Beobachtung hingegen nicht gemacht werden. Die HSS konnte auch nach dem Verblühen noch in den Wurzeln nachgewiesen werden (Moll et al., 2002). Diese Vermutung konnte jedoch in weiteren Experimenten nicht bestätigt werden, da die Abbauprodukte auch in Proteinextrakten von ausschließlich jungen, weißen Wurzeln nachgewiesen werden konnten. Als weitere mögliche Ursache für diesen wahrscheinlich im Anschluß an das Abschneiden der Pflanze erfolgenden Abbau der HSS wurde dann eine Verunreinigung der für die Aufarbeitung der Proben eingesetzten Chemikalien in verschiedenen Versuchen eindeutig ausgeschlossen.

Überraschenderweise ergaben die Proteinextrakte von Wurzelorgankulturen von *S. jacobaea* im Western Blot nur ein deutliches Signal für die HSS bei 44 kDa. Die HSS aus diesen unter sterilen Bedingungen kultivierten Wurzeln unterlag also keinem Abbau, was eine Kontaminierung mit Proteasen durch äußere Faktoren wahrscheinlich werden ließ. In weiteren Untersuchungen mit den sterilen Wurzelorgankulturen als Referenz konnte schließlich zweifelsfrei die den Wurzeln anhaftende Erde, die gerade bei den dünnen Wurzeln nicht immer vollständig entfernt werden konnte, als Ursprung der Verunreinigung identifiziert werden. Darüber hinaus konnte durch Hemmversuche belegt werden, daß es sich bei der Verunreinigung aus der Erde um eine mit dem Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) hemmbare Protease handelt. In daraufhin durchgeführten

Proteinextraktionen von in Erde kultivierten Wurzeln unter Zusatz von PMSF zum Extraktionspuffer konnte kein Abbau der HSS gefunden werden.

Da der affinitätsgereinigte spezifische HSS-Antikörper jedoch auch die Fragmente spezifisch erkannt hatte, konnte von einer Wiederholung sämtlicher Expressionsanalysen abgesehen werden, da sie zu keinen neuen Erkenntnissen geführt hätten. Eine Auswirkung dieses Abbaus auf die Ergebnisse der Immunlokalisation im Gewebe kann ebenso ausgeschlossen werden, da die Spezifität der jeweiligen Markierung durch zusätzliche *in situ* Unterfütterungsexperimente nachgewiesen wurde.

In zukünftigen Versuchen könnte dem Extraktionspuffer generell ein Proteinaseinhibitor zugesetzt werden, zumal er den weiteren Verlauf und die abschließende Detektion nicht stört. Ein Ausschneiden der Abbaubanden mit einer anschließenden Sequenzanalyse könnte darüber hinaus weitere Aufschlüsse über den Abbau der HSS liefern, z.B. um aufzuklären an welchen Stellen die HSS gespalten wird.

#### 4.1.3 Vergleich RT-PCR und Western Blot

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur organspezifischen Expression der HSS in *C. officinale*, *S. officinale* und *H. indicum* wurden hinsichtlich der Auswahl der pflanzlichen Gewebe an den zuvor von Reimann (2007) durchgeführten Transkriptionsanalysen ausgerichtet, um eine Vorauswahl der Gewebe zu treffen und die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

Beim Vergleich der Daten aus der RT-PCR mit den Ergebnissen der durchgeführten Immunoblots (s. Tab. 4.1) wird deutlich, daß in allen Fällen, in denen eine Expression des HSS-Proteins detektiert werden konnte, die entsprechende mRNA in der RT-PCR nachgewiesen wurde. Umgekehrt traf diese Beobachtung nicht immer zu, da in einigen Geweben die transkribierte HSS nicht im Western Blot nachgewiesen werden konnte.

Diese Diskrepanz zwischen Transkription und Expression kann verschiedene Ursachen haben und wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits für *Phalaenopsis* spec. (Orchidaceae) beschrieben. Transkripte der HSS im Blatt und im jungen Stengel von *Phalaenopsis* spec. konnten auf Proteinebene im Western Blot nicht bestätigt werden (Anke, 2004b; Nurhayati, 2004). Bei den damals detektierten positiven Signalen in der RT-PCR handelte es sich jedoch wahrscheinlich um sogenannte „prozessierte Pseudogene“, die in den *Phalaenopsis*-Hybriden vermehrt vorkommen (Nurhayati, 2004). Für das Vorhandensein von Pseudogenen in den untersuchten Vertretern aus der Familie der Boraginaceae liegen



jedoch keine Anzeichen vor. In PCR-Analysen mit den jeweiligen Expressionsprimern gegen die genomische DNA als Template wurden keine Produkte gefunden, die in ihrer Größe mit der cDNA der HSS übereinstimmen und damit „prozessierte Pseudogene“ zur Ursache haben könnten (Reimann, 2007).

Eine weitere Ursache für diese Unterschiede kann durch den unterschiedlichen Zeitpunkt der Probenentnahme für RT-PCR und Western Blot begründet werden. Wie in der Vergangenheit bereits am Beispiel *E. cannabinum* gezeigt wurde, kann die Expression der HSS im Verlauf der Vegetationsperiode deutliche Schwankungen von sehr starker Expression im Knospenstadium bis hin zu einer nicht mehr detektierbaren Expression im fruchtenden Stadium aufweisen (Anke et al., 2004). Daß es auch bei *S. officinale* einen Einfluß der Vegetationsperiode auf die Expression der HSS gibt, konnte bereits durch den Western Blot mit den jungen, endständigen Blättern von Seitentrieben belegt werden (s. Kap. 3.2.3.1). Ein Signal für die HSS konnte nur in den jungen Blättern detektiert werden, die ausschließlich von Seitentrieben mit Blütenknospen stammten. Nach dem Aufblühen der Knospen konnte im Western Blot ebenso wie in den Blättern, die von entsprechenden Seitentrieben ohne Knospen geerntet wurden, keine HSS detektiert werden. Somit ist es wahrscheinlich, daß Pflanzenproben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet wurden, Unterschiede in der Expression der HSS aufweisen. Da die Transkripte der HSS sowohl in jungen als auch in alten Blättern durch RT-PCR nachgewiesen wurde, handelt es sich hierbei möglicherweise um spezifische posttranskriptionale Regulationsmechanismen. Der verstärkte Schutz des reproduktiven Apparates im sensiblen Knospenstadium durch diese zuschaltbare PA-Biosynthese in Form einer „Boosterung“ direkt vor Ort in den jungen Blättern wäre eine mögliche Erklärung für diesen zusätzlichen regulatorischen Aufwand. Eine ganz ähnliche Beobachtung wurde bei Tracerversuchen mit den Knospen von *Phalaenopsis* spec. gemacht. Während die jungen Knospen in Bezug auf den Einbau radioaktiv markierter Vorstufen am effektivsten waren, nahm die PA-Biosyntheseaktivität mit zunehmenden Alter ab, bis sie mit dem Öffnen der Knospen ganz verloren ging (Anke et al., unveröffentlicht). Die zeitliche Begrenzung der HSS-Expression in den Blättern von *S. officinale* könnte darüber hinaus auch ein Grund dafür sein, daß in früheren biochemischen Charakterisierungen keine Synthese der PAs in oberirdischen Organen beschrieben worden ist und daß in den zuvor durchgeführten Immunoblots kein Signal in den Blättern detektiert werden konnte. Weitere Untersuchungen z.B. in Form radioaktiver Fütterungsexperimente müssen nun zeigen, ob die Biosynthese der PAs in den jungen Blättern auf der Stufe des Homospermidins beendet

ist oder aber bis zu den Endprodukten durchläuft.

Das Signal der HSS aus den jungen Blättern von *S. officinale* war im Vergleich zu den positiven Signalen der jungen Wurzel nur sehr schwach und konnte im Immunoblot erst nach längerer Exponierung des Röntgenfilms sichtbar gemacht werden. Hieraus wird eine weitere mögliche Ursache für die in der Tabelle 4.1 dokumentierten Unterschiede ersichtlich, nämlich die wesentlich geringere Nachweisgrenze des Western Blot im Vergleich zu einer RT-PCR. Ein Western Blot erfäßt lediglich das bereits vorhandene Protein wohingegen bei einer RT-PCR durch die Amplifikation die gesuchte cDNA vervielfältigt wird. Während die RT-PCR noch eine deutliche Bande für die Transkripte ergibt, kann die Expression bereits unter der Nachweisgrenze des Western Blot liegen. Ein ebenfalls schwaches Signal im Immunoblot ergaben die Proteinextrakte aus dem jungen Blatt, dem jungen Sproß und der Knospe von *H. indicum*. Hier könnten jedoch auch noch Verdünnungseffekte zu einer Abschwächung des Signals beigetragen haben, da die HSS nur in der Epidermis lokalisiert ist, der Proteinextrakt jedoch aus dem jeweils gesamten Organ gewonnen wurde. Letztlich könnte es sich auch um Produkte der Transkription handeln, die nicht translatiert werden, wobei man sich hier natürlich die Frage nach einem möglichen biologischen Sinn dieser nicht vollständigen Proteinbiosynthese für die Pflanze stellen muß.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Vergleich der RT-PCR- und Western Blot-Proben zeigt, daß beide Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Ergebnisse der RT-PCR und des Western Blot können nicht direkt miteinander verglichen werden, da die entsprechenden Proben nicht gemeinsam gesammelt worden sind. Aber selbst bei der Verarbeitung der gleichen Probe können Differenzen auf Grund der unterschiedlichen Nachweismethode und -grenze nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.1.4 *Cynoglossum officinale*

In der vorliegenden Arbeit durchgeführte vergleichende Untersuchungen der gewebespezifischen Expression der HSS durch Western Blot auf Proteinebene belegten eine Expression der HSS in den Wurzeln der ein- und zweijährigen Pflanze. Dabei konnte in der zweijährigen Pflanze jedoch nur in den frisch austreibenden, weißen Wurzeln ein Signal detektiert werden, in den alten braunen, z.T. bereits verdickten Wurzeln des Vorjahres war keine HSS mehr nachweisbar. Hier zeigten sich interessante Parallelen zur mehrjährigen Staude *E. cannabinum*, wo die HSS ebenfalls nur in den frischen, jährlich

|                                      | Wurzel jung |   | Wurzel alt |     | Sproß jung |   | Sproß alt |   | Blatt jung |   | Blatt alt |   | Knospe |   | Blüte |   | Frucht |   |
|--------------------------------------|-------------|---|------------|-----|------------|---|-----------|---|------------|---|-----------|---|--------|---|-------|---|--------|---|
| <i>Cynoglossum off.</i> (einjährig)  | +           | + |            |     |            |   | +         | - |            |   |           |   |        |   |       |   |        |   |
| <i>Cynoglossum off.</i> (zweijährig) | +           | + | -          | (+) | -          |   | +         | - | -          | - | +         | - | -      | - | -     | - | -      | - |
| <i>Symphytum off.</i>                | +           | + | +          | -   | -          | - | +         | - | +          | - | +         | - | -      | - | +     | - |        |   |
| <i>Heliotropium ind.</i>             | (+)         | - |            | +   | +          | + | +         | - | +          |   | +         | + | +      | + | +     | - | +      | - |

**Tabelle 4.1: Vergleich der gewebespezifischen Transkription und Expression der HSS in den untersuchten Vertretern der Boraginaceae.** In dieser Übersicht wurden die Ergebnisse der Expressionsanalysen durch Western Blot den von Reimann (2007) parallel dazu durchgeführten Transkriptionsanalysen durch RT-PCR tabellarisch gegenübergestellt. Die Ergebnisse der RT-PCR stehen jeweils in der linken Spalte und sind zur besseren Übersicht grau unterlegt. Legende: + Signal; (+) schwaches Signal; - kein Signal. Bei nicht untersuchten Geweben wurde das jeweilige Feld leer gelassen. Abkürzungen: *Cynoglossum off.*: *Cynoglossum officinale*, *Symphytum off.*: *Symphytum officinale*, *Heliotropium ind.*: *Heliotropium indicum*.

neu austreibenden Wurzeln nachgewiesen wurde (Anke et al., 2004). Diese Beobachtung wurde auch durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an den mehrjährigen Stauden *S. officinale* und *S. jacobaea* zusätzlich bestätigt. In allen bisher in unserer Arbeitsgruppe untersuchten, mehrjährigen PA-produzierenden Pflanzen, die ihre PAs vollständig bzw. teilweise in der Wurzel synthetisieren, wurde die HSS immer in den jungen, jährlich neu austreibenden Wurzeln nachgewiesen. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnten die anatomischen und physiologischen Veränderungen der wachsenden Wurzel sein, die zu einem Abschalten der HSS-Expression führen. Im Fall der hier untersuchten Boraginaceae *C. officinale* ist die HSS-Expression in den Zellen des Perizykels und der Endodermis lokalisiert. Diese Zellbereiche der Wurzel sind im Zuge des sekundären Dickenwachstums starken Veränderungen unterworfen. Mit beginnendem sekundären Dickenwachstum werden Teile des Perizykels wieder meristematisch und bilden mit den ebenfalls meristematischen Parenchymzellen zwischen Xylem und Phloem das Kambium, welches im weiteren Verlauf nach innen Xylem- und nach außen Phloemelemente abgliedert. Dieser komplette Wandel hinsichtlich Morphologie und Physiologie ist eine mögliche Erklärung für das Fehlen der HSS-Expression in diesen Zellen. Aber auch die Zellen der Endodermis unterliegen dabei Veränderungen: Nachdem die Endodermis das Wachstum eine Zeitlang übersteht reißt sie wie das sich anschließende Rindenparenchym und die Exodermis bei einem Fortschreiten des Wachstums ein und wird durch ein sekundäres Abschlußgewebe ersetzt. Eine Expression der HSS in den Zellen der Endodermis ist in diesem Stadium somit nicht mehr möglich. Dieser Zusammenhang wurde von Anke auch für die von ihm untersuchte Expression der HSS in *E. cannabinum* beschrieben: Mit dem Einsetzen des sekundären Dickenwachstums konnte keine Expression der HSS mehr in den Zellen des Rindenparenchyms der Wurzeln nachgewiesen werden (Anke et al., 2004). Darüber hinaus konnte er im Western Blot zeigen, daß die Expression der HSS in *E. cannabinum* zusätzlich in Abhängigkeit von der Jahreszeit reguliert wird. Während die Expression im Knospenstadium ihr Maximum erreichte, nahm sie nach dem Aufblühen der Knospen ab bis sie im Stadium der Frucht-reife überhaupt nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich dazu konnte in der einjährigen Pflanze *S. vernalis* im Western Blot keine Abhängigkeit zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien und der HSS-Expression beobachtet werden (Moll et al., 2002).

Frühere radioaktive Fütterungsversuche an isolierten Sproßsystemen der einjährigen Rosettenpflanze von *C. officinale* haben einen Einbau der radioaktiv markierten Vorstufe

[<sup>14</sup>C]-Putrescin in PAs aufgezeigt. Die dabei isolierten Endprodukte wichen von den in der Wurzel synthetisierten PAs ab (Van Dam et al., 1995b). In einem in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot wurden gezielt Rosettenpflanzen im gleichen Entwicklungsstadium wie für die radioaktiven Fütterungsversuche untersucht, nachdem in einem ersten Immunoblot aller Gewebe der ein- und zweijährigen Pflanze keine Anzeichen für eine oberirdische Expression der HSS gefunden wurden. Dabei konnte die HSS nur in den Proteinextrakten aus dem Bereich des Apikalmeristems nachgewiesen werden. Das im Vergleich zur Positivkontrolle relativ schwache Signal kann zwei Ursachen haben: Zum einen könnte die Expression der HSS auf zellulärer Ebene sehr begrenzt um das Apikalmeristem lokalisiert sein, was bedeutet, daß das Signal im Western Blot durch Verdünnung mit anderen Geweben abgeschwächt wird. Ein Zusammenhang zwischen der PA-Biosynthese und dem Wachstum wurde ja bereits früher aufgrund von Tracerversuchen an Wurzelkulturen von *Senecio erucifolius* vermutet, in denen die höchste Biosyntheseaktivität im apikalen Teil der Wurzeln nachgewiesen wurde (Sander und Hartmann, 1989). Auch in den Luftwurzelspitzen von *Phalaenopsis* spec. konnte die HSS im Grundmeristem um das Apikalmeristem herum lokalisiert werden (Anke, 2004b). Zudem spricht für diese mögliche Kopplung, daß die Synthese der PAs über die Polyamine Spermidin und Putrescin verläuft, denen eine bedeutende Rolle in der Regulation von Wachstum und Entwicklung von Pflanzen zugeschrieben wird (Galston und Kaur-Sawhney, 1995). So wird z.B. Spermidin wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben von der DHS zur Modifizierung des eukaryontischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A) benötigt, dessen Funktion noch nicht vollständig verstanden ist, der jedoch an Wachstumsprozesse beteiligt zu sein scheint. Eine andere Ursache für dieses schwache Signal im Western Blot könnte darin begründet sein, daß bei der Präparation des Apikalmeristems Reste des Übergangsbereichs Wurzel/Sproß nicht vollständig abgetrennt wurden. Die Präparation der Gewebe erfolgte rein visuell ohne optische Hilfsmittel. Hier wären in der Zukunft weitere Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression sowie eine genaue Lokalisation der HSS auf zellulärer Ebene z.B. durch die mikroskopische Untersuchung von entsprechenden Längsschnitten im Übergangsbereich zwischen Wurzel und Sproß interessant.

In anschließenden Studien zur zellulären Lokalisation der HSS in den jungen, frisch austreibenden Wurzeln zeigte sich eine hochspezifische Expression in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Wurzel. Im noch undifferenzierten Bereich im direkten Anschluß an die Wurzelhaube konnte keine HSS nachgewiesen werden. Erst mit Ausbildung einer reifen Endodermis mit Caspary-Streifen konnte die HSS in den Zellen der

Endodermis detektiert werden. Mit fortschreitender Entwicklung der Wurzel beginnen auch die Zellen des Perizykels mit der HSS-Expression bis schließlich in der voll ausdifferenzierten Wurzel mit bereits austreibenden Lateralwurzeln Zellen der Endodermis und des Perizykels in die PA-Biosynthese involviert sind. Mit dem Einsetzen des sekundären Dickenwachstums wurde die Expression der HSS wie bereits oben beschrieben komplett abgeschaltet.

Lateralwurzeln entstehen im Bereich des Perizykels. Dabei beginnen sich die Zellen des Perizykels peri- und antiklinal zu teilen, wodurch das Wurzelprimordium gebildet wird (Esau, 1977). Interessanterweise war die Expression der HSS in den Zellen der Endodermis und des Perizykels im Bereich einer neu entstehenden Seitenwurzel abgeschaltet, eine Beobachtung, die Hashimoto et al. ebenso für die Hyoscyamin-6 $\beta$ -Hydroxylase (H6H) in *H. niger* beschrieben hat (Hashimoto et al., 1991). Die H6H katalysiert die beiden letzten Schritte in der Scopolamin-Biosynthese und wird im Perizykel junger Wurzeln von *Hyoscyamus niger* (Solanaceae) exprimiert.

Die Expression der durch Genduplikation aus der DHS entstandenen HSS wird somit sehr individuell in Abhängigkeit von vielen verschiedenen physiologischen Prozessen wie z.B. dem Wurzelwachstum der Pflanze geregelt.

#### 4.1.5 *Symphytum officinale*

Erste im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression der HSS in der mehrjährigen Staude *S. officinale* ergaben eine Expression ausschließlich in den jungen, weißen, jährlich neu austreibenden Wurzeln. Bereits in früheren biochemischen Versuchen konnte Frölich (1996) zeigen, daß Wurzelorganokulturen von *S. officinale* zur PA-Biosynthese befähigt sind. In den alten Wurzeln des Vorjahres konnte, wie schon bereits bei der zweijährigen Pflanze *C. officinale* beschrieben (s. Kap. 4.1.4), keine Expression der HSS mehr detektiert werden. Überraschenderweise ergaben parallel zu den Expressionsanalysen durchgeführte molekularbiologische Untersuchungen durch RT-PCR eine Transkription der HSS in den jungen und alten Blättern (Reimann, 2007). In einem daraufhin durchgeführten Western Blot konnte die HSS in jungen, endständigen Blättern eines Seitentriebes, der ausschließlich Knospen trägt, nachgewiesen werden (s. Kap. 3.2.3.1). Nach dem Aufblühen der Blüten konnte ebenso wie in vergleichbaren Seitentrieben ohne Blütenanlage keine HSS mehr im Immunoblot nachgewiesen werden. Somit konnte die Expression der HSS nicht nur in den

Wurzeln sondern darüber hinaus auch in den jungen Blättern von *S. officinale* bestätigt werden. Die Beschränkung der HSS-Expression auf junge Blätter von Seitentrieben mit ausschließlich Blütenknospen zeigt darüber hinaus aufschlußreiche Parallelen zu *E. cannabinum*, wo Anke in Studien zur gewebespezifischen Expression zeigen konnte, daß die Expression der HSS im Knospenstadium ihr Maximum erreicht, bevor sie danach wieder abfällt und im fruchtenden Stadium nicht mehr detektiert werden kann (Anke et al., 2004). Ganz offensichtlich ist die auf die Verteidigung der Pflanze ausgerichtete PA-Biosynthese besonders aktiv im Knospenstadium, um den für das Überleben der Art essentiellen Fortpflanzungsapparat zu schützen. In diesem Sinne könnte ein Zuschalten der PA-Biosynthese in den jungen, endständigen und somit den Knospen räumlich nahe stehenden Blättern in Form einer „Boosterung“ zusätzlichen Schutz der reproduktiven Organe bieten. Erste Fütterungsexperimente an isolierten jungen Blättern von *S. officinale* mit der radioaktiv markierten Vorstufe [<sup>14</sup>C]Putrescin ergaben Hinweise, daß die Biosynthese in den Blättern über die Stufe des Homospermidins hinausgeht (Reimann, 2007). Hier könnte in der Zukunft mit weiteren Tracerversuchen das Spektrum der PAs in den jungen Blättern untersucht und mit den bereits bekannten Daten aus der Wurzel verglichen werden. Ähnliche Untersuchungen an *C. officinale* und *H. indicum* haben bereits in der Vergangenheit aufgezeigt, daß es Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung der PAs zwischen den unterschiedlichen Organen gibt (Frölich, 1996). Ferner könnte die Untersuchung des Verlaufs der HSS-Expression in den Wurzeln und den jungen Blättern zu verschiedenen Zeitpunkten der Vegetationsperiode in Analogie zu den von Anke (2004) durchgeführten Versuchen mit *E. cannabinum* einen interessanten Einblick in die offensichtlich sehr differenzierten Regulationsmechanismen geben.

Bei den Immunolokalisationsstudien der HSS in den jungen, weißen, jährlich neu austreibenden Wurzeln von *S. officinale* zeigte sich eine Expression der HSS ausschließlich in den Zellen der Endodermis. Dieses Expressionsmuster änderte sich im Gegensatz zur parallel untersuchten Expression der HSS in den Wurzeln von *C. officinale* nicht in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Wurzel und konnte für alle untersuchten Wurzeln reproduzierbar dokumentiert werden. Hier zeigten sich erste Unterschiede in der zellulären Expression der HSS zwischen den beiden Boraginaceen *C. officinale* und *S. officinale*. Obwohl in beiden Pflanzen die Wurzel Ort der PA-Biosynthese ist, wird die Expression der HSS auf zellulärer Ebene individuell reguliert. Nach dem Einsetzen des sekundären Dickenwachstums konnte keine Expression der HSS mehr nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wurde bereits bei *C. officinale* beschrieben und kann mit den

Veränderungen der Zellen der Endodermis im Verlauf des Dickenwachstums der Wurzel begründet werden. Ebenso war die Expression im Bereich einer sich neu ausdifferenzierenden Seitenwurzel abgeschaltet.

Erste zelluläre Lokalisationsstudien der HSS in den jungen Blättern ergaben eine Expression der HSS in den Zellen der Bündelscheide. Interessanterweise wurde mit den Zellen der Bündelscheide ein zur Endodermis der Wurzel analoges Gewebe (Esau, 1977) als Sitz der HSS identifiziert. Wie die Endodermis in den Wurzeln grenzt die Bündelscheide das Leitgewebe von den umgebenden Parenchymzellen ab und kontrolliert den Ein- und Ausstrom von Stoffen. Für den Fall, daß die PAs und Intermediate wie für die Asteraceae *S. vulgaris* beschrieben über das Phloem abtransportiert werden, würde die Expression der HSS und somit die Biosynthese der PAs im Inneren dieser Abgrenzung günstig erscheinen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur noch mit den Lokalisationsstudien begonnen werden, eine Überprüfung der Spezifität der Markierung durch die in Kapitel 3.1.4.1 beschriebenen Unterfütterungsversuche wurde nicht mehr durchgeführt. Da die Spezifität des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers bereits für die Wurzel von *S. officinale* eindeutig bewiesen worden ist, kann auch für die Zellen der Bündelscheide von einer spezifischen Markierung der HSS ausgegangen werden. Interessant wären hier noch einmal Vergleiche auf subzellulärer Ebene mit der Markierung der Endodermis in den Wurzeln.

#### 4.1.6 *Heliotropium indicum*

Der ebenfalls zur Familie der Boraginaceae gehörende, subtropische und immergrüne Strauch *H. indicum* wurde für die vergleichenden Expressionsanalysen auf Gewebe- und zellulärer Ebene ausgewählt, da er in früheren Tracerversuchen eine Biosynthese der PAs in allen Teilen der Pflanze mit Ausnahme der Wurzeln gezeigt hat (Frölich, 1996). Dabei konnte Frölich zeigen, daß isolierte Wurzeln zwar zur Synthese von Homospermidin befähigt sind, dieses jedoch nur bis zu einem chemisch nicht weiter charakterisierten Zwischenprodukt „X“ umgesetzt wird (Frölich, 1996). Diese Ergebnisse konnten durch Untersuchungen auf Proteinebene, die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestätigt werden. Im Western Blot wurde die HSS in den jungen Blättern, im jungen Sproß und in der Knospe nachgewiesen (s. Kap. 3.3.3). Darüber hinaus konnte durch einen Immunoblot verschiedener Blattstadien eine Abhängigkeit der HSS-Expression vom Entwicklungsstadium des Blattes aufgezeigt werden (s. Kap. 3.3.3.1). Das stärkste Signal



wurde in den jungen Blättern detektiert, mit Zunahme der Blattgröße nahm die Signalstärke ab, bis ab einer bestimmten Blattgröße keine HSS mehr nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlich wird die Biosynthese des Homospermidins und damit auch der PAs in den alten Blättern sukzessive heruntergefahren bis sie schließlich mit Beginn der Seneszenz nicht mehr nachweisbar ist. Auch in diesem Fall konnten die von Fröhlich (1996) in Fütterungsexperimenten ermittelten Daten, die einen erhöhten Einbau der markierten Vorstufe in den jungen Geweben, insbesondere im jungen Blatt gemessen hatte, auf Expressionsebene bestätigt werden.

In anschließend durchgeführten Immunolokalisationsstudien wurde die HSS in den Zellen der unteren Epidermis der Blätter lokalisiert (s. Kap. 3.3.4). Auffällig war in diesem Zusammenhang, daß die obere Epidermis keine Expression der HSS aufwies. Möglicherweise ist dieses Expressionsmuster das Ergebnis einer Anpassung an den subtropischen Lebensraum dieser Pflanze. Eine weitere Besonderheit bestand darin, daß die Expression der HSS in den Zellen der Epidermis im Bereich von Haarzellen und Schließzellen unterbrochen war. Haar- und Schließzellen entstehen zwar aus den Zellen der Epidermis, jedoch entwickeln sie sich schon früh im Verlauf der Ontogenese unabhängig von ihr entsprechend ihrer späteren Funktion z.B. als Teil des Spaltöffnungsapparates für die Pflanze. Diese Unterschiede auf morphologischer und physiologischer Ebene könnten eine Erklärung dafür sein, daß in ihnen im Gegensatz zu den Zellen der Epidermis keine HSS exprimiert und damit keine PAs synthetisiert werden. Diese differentielle Expression der HSS steht im Gegensatz zur Expression z.B. der Chalkonsynthase (CHS), die an der Biosynthese der Flavonoide beteiligt ist. Die CHS konnte durch Immunolokalisation sowohl in den Zellen der Epidermis als auch in den Schließzellen der jungen Blätter von *Spinacia oleracea* (Amaranthaceae) nachgewiesen werden, wobei die Zellen der oberen Epidermis eine durchweg stärkere Markierung aufwiesen als die Zellen der unteren Epidermis (Beerhues et al., 1988). Die CHS katalysiert die Kondensation der aktivierten Vorstufen 4-Cumaryl-CoA und Malonyl-CoA zum Chalkongrundgerüst und nimmt damit eine Schlüsselposition in der Biosynthese der Flavonoide ein. Flavonoide dienen der Pflanze vor allem als Schutz vor den schädlichen UV-Strahlen der Sonne. Vor diesem Hintergrund erscheint die Synthese und Speicherung der Flavonoide in den sonnenexponierten Zellen der Epidermis plausibel und ist ein weiteres Beispiel für die im Verlauf der Evolution erfolgte Anpassung der Pflanzen an ihre Umwelt.

In weiteren Lokalisationsstudien auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, daß die Expression der HSS im Blattstiel sowie im jungen Sproß ebenfalls in den Zellen der Epi-

dermis lokalisiert ist und somit das gleiche Expressionsmuster aufweist. Die vorliegenden Daten legen somit eine einheitliche Expression der HSS in den oberirdischen Organen von *H. indicum* nahe. Lediglich in der Knospe konnte die HSS noch nicht auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden, obwohl sie im Western Blot ein positives Signal ergeben hat. Die Knospen sitzen bei *H. indicum* neben den Blüten und den Früchten auf einer Blütenstandsachse und bilden zusammen den als Wickel charakterisierten Blütenstand. Möglicherweise ist die HSS in Analogie zum Blattstiel ebenfalls in den Epidermiszellen der Blütenstandsachse lokalisiert. Hieraus ergeben sich weitere Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen zur Immunolokalisation der HSS in den Knospen von *H. indicum*. Die dadurch erhaltenen Daten könnten dann mit den bereits vorliegenden Daten aus *Phalaenopsis* spec. verglichen werden, wo bereits ebenfalls eine Lokalisation der HSS in der Knospe gezeigt wurde.

In subzellulären Untersuchungen mit Hilfe des TEM konnte eindeutig belegt werden, daß die Lokalisation der HSS auf die Zellen der Epidermis begrenzt ist, eine Expression in den darunter liegenden Zellen des Kollenchyms wurde ausgeschlossen (s. Kap. 3.3.8). Dabei zeigte sich zugleich, daß die HSS im Cytosol der Epidermiszellen vorkommt und somit nicht in Organellen kompartimentiert oder mit ihnen assoziiert ist.

#### 4.1.7 *Senecio jacobaea*

Die bisherigen Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression der HSS an verschiedenen Vertretern aus der Familie der Asteraceae haben eine Expression der HSS ausschließlich in den Wurzeln gezeigt. Dabei zeigten sich jedoch Unterschiede auf zellulärer Ebene zwischen *E. cannabinum* (Tribus Eupatorieae) und *S. vernalis* (Tribus Senecioneae). Während in den Wurzeln von *S. vernalis* die HSS in Zellgruppen bestehend aus Zellen der Endodermis und des angrenzenden Rindenparenchyms exprimiert wird, konnte die HSS in den jungen, jährlich neu austreibenden Wurzeln der mehrjährige Staude *E. cannabinum* im gesamten Rindenparenchym lokalisiert werden (Anke et al., 2004; Moll et al., 2002). Mit *S. jacobaea* stand nun eine weitere Asteraceae aus dem Tribus der Senecioneae für eine vergleichende Expressionsanalyse zur Verfügung, um Hinweise auf mögliche Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Regulation der HSS-Expression innerhalb dieser Gattungsgruppe zu bekommen.

Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit vergleichende Untersuchungen von Geweben auf Proteinebene durch Western Blot durchgeführt, die eine ausschließliche Expression der

HSS in den jungen, jährlich neu austreibenden Wurzeln der mehrjährigen Staude *S. jacobaea* ergaben. Damit konnte auch für *S. jacobaea* wie bereits zuvor für *S. vernalis* und *E. cannabinum* die Wurzel als Sitz der PA-Biosynthese identifiziert werden. Im Unterschied zu *S. vernalis* war die Expression auf die jungen, jährlich neu austreibenden Wurzeln beschränkt. Diese bereits bei *C. officinale* beschriebene und diskutierte Beobachtung (s. Kap. 4.1.4) scheint mit den anatomischen und physiologischen Veränderungen der Wurzel im Verlauf ihrer Entwicklung beginnend mit dem sekundären Dickenwachstum verbunden zu sein.

In daraufhin durchgeführten Studien zur zellulären Expression der HSS in den jährlich neu gebildeten Wurzeln von *S. jacobaea* zeigte sich eine Expression der HSS in klar abgegrenzten Gruppen von Zellen der Endodermis und des angrenzenden Rindenparenchyms. Diese Zellgruppen waren jeweils gegenüber dem Phloem angeordnet. Genau dieses Expressionsmuster wurde von Moll (2002) auch in früheren Arbeiten für *S. vernalis* dokumentiert und läßt somit eine einheitliche Regulation der Expression der HSS auf zellulärer Ebene innerhalb der Gattungsgruppe der Senecioneae vermuten. Dieses charakteristische Expressionsmuster ist auch in Übereinstimmung mit der anatomischen Organisation der jeweiligen Wurzel. Es konnte in den triarchen Wurzeln von *S. vernalis* ebenso gefunden werden wie in den tetrarchen Wurzeln von *S. jacobaea*.

#### **4.1.8 Vergleich der HSS-Expression mit anderen Enzymen des Sekundärstoffwechsels**

Die HSS ist im Verlauf der Angiospermen-Evolution mehrfach unabhängig aus der DHS durch Genduplikation entstanden. Im Anschluß daran erfolgte sowohl eine Anpassung der Funktion (Beibehalten der HSS-Aktivität für die PA-Biosynthese, Verlust der DHS-Aktivität) als auch der Regulation z.B. in Form der gewebespezifischen Expression an die neue Rolle im Stoffwechsel der Pflanze. Das Expressionsmuster der HSS weist, wie man der Tabelle in Abb. 4.2 entnehmen kann, Unterschiede auf Gewebe- und Zellebene sowohl zwischen den unterschiedlichen Familien als auch innerhalb der einzelnen Familien auf. Der polyphyletische Ursprung der HSS innerhalb der Angiospermen reicht hier nicht allein als Begründung aus, da sogar Spezies innerhalb einer Familie, in der die HSS nur einmal aus der DHS hervorgegangen ist, signifikante Unterschiede in der Regulation der HSS-Expression aufzeigen. Ein Beispiel dafür ist die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Expression der HSS innerhalb drei verschiedener Vertreter aus der Familie

der Boraginaceae. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Expression der HSS für jede Spezies individuell und hochspezifisch an den jeweiligen Stoffwechsel angepasst reguliert wird, wobei die Funktion der HSS als Schlüssel zu einem effektiven Fraßschutz in Form der PAs unter dem Selektionsdruck der Herbivorie immer beibehalten wurde. In früheren „Ringelungs“-Experimenten konnte gezeigt werden, daß die PAs in *S. vulgaris* aus der Wurzel als ausschließlicher Ort der PA-Biosynthese über das Phloem in die oberirdischen Organe der Pflanze transportiert werden (Hartmann et al., 1989). Zusätzlich bestätigt wurde dieser spezifische Phloemtransport der PAs in *Senecio*-Arten durch Analysen mit den phloemsaugenden Aphiden *Myzus persica* und *Aphis jacobaeae* (Molyneux et al., 1990; Witte et al., 1990). Damit unterscheiden sie sich in Bezug auf ihren Transport von den Tropanalkaloiden, die über das Xylem transportiert werden (Luckner, 1990). Eine kurze räumliche Distanz der PA-Biosynthese zum Phloem bringt der Pflanze somit zum einen eine effiziente Versorgung der Biosynthese mit den Ausgangsstoffen (z.B. Aminosäuren) sowie darüber hinaus einen schnellen Abtransport von Zwischen- und Endprodukten zum jeweiligen Zielort (z.B. Blüten). Ob der Transport der PAs für die Boraginaceen *C. officinale* und *S. officinale* ebenfalls über das Phloem erfolgt, ist noch nicht endgültig geklärt. Daß die in der Wurzel von *S. officinale* gebildeten PAs in die oberirdischen Organe transportiert werden, ist sehr wahrscheinlich, da in Sproßkulturen ohne Wurzel im Gegensatz zur ganzen, intakten Pflanze keine PAs gefunden wurden (Hartmann, unveröffentlicht). Mit der Lokalisierung der HSS in der Endodermis von *S. officinale* bzw. Endodermis und Perizykel von *C. officinale* ist zumindest die räumliche Nähe zum Leitbündel als Transportbahn gegeben. Im Fall von *S. jacobaea*, wo die HSS in den Zellen der Endodermis und des angrenzenden Rindenparenchyms nachgewiesen wurde, werden die PAs wie für *S. vulgaris* beschrieben über das direkt angrenzende Phloem in die oberen Organe der Pflanze transportiert. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage, wie die Produkte der PA-Biosynthese in den jungen Blättern und im Sproß von *H. indicum* abtransportiert werden. Da in den Wurzeln von *H. indicum* PAs detektiert wurden obwohl die Wurzeln nicht zur PA-Biosynthese befähigt sind, müssen sie aus einem PA-produzierenden Organ der Pflanze wie z.B. dem Sproß in die Wurzel transportiert worden sein (Frölich, 1996).

Die Frage nach der Art des interzellulären Transports (symplasmatisch oder apoplastisch) der Intermediate und/oder der Endprodukte zum Ort der Translokation ist bisher für noch keine PA-führende Pflanze beantwortet worden. Gegen einen möglichen apoplastischen Transport sprechen die Ergebnisse früherer Fütterungsexperimente an Wur-

zelorgankulturen von *Senecio*-Arten. Das gefütterte, radioaktiv markierte [ $^{14}\text{C}$ ]Putrescin wurde von der Pflanze aufgenommen, in PA-*N*-Oxide eingebaut und konnte danach nicht mehr im Medium detektiert werden. Im Falle eines apoplasmatischen Transports wäre zumindest ein teilweises Austreten der Produkte ins Medium zu beobachten gewesen. Aber auch Hinweise für einen symplasmatischen Transport wie z.B. eine erhöhte Anzahl von Plasmodesmen konnten bisher auf subzellulärer Ebene nicht beobachtet werden (Moll et al., 2002).

Die sichere Speicherung der PAs erfolgt in Form ihrer nicht toxischen und wasserlöslichen *N*-Oxide in der Vakuole. Dabei lassen kinetische Daten und Versuche zur Hemmung von ATPasen auf einen Carrier-abhängigen Transport durch den Tonoplasten in die Vakuole schließen (Ehmke et al., 1988). Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für die Speicherung der Monoterpen-Indol-Alkaloide in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) und der Benzylisochinolin-Alkaloide in *Fumaria capreolata* (Fumariaceae) nachgewiesen (Deus-Neumann und Zenk, 1984, 1986). Eine passive Diffusion und Speicherung der PAs in der Vakuole nach dem „ion-trap“-Mechanismus konnte somit ausgeschlossen werden.

Weitere Untersuchungen z.B. in Form von weiterführenden Lokalisationsstudien in der Zukunft müssen klären, ob und wie die Alkaloide und entsprechende Intermediate intra- und interzellulär transportiert werden. Besonders interessant wäre die gleichzeitige Lokalisation von weiteren an der Biosynthese der PAs beteiligten Enzyme wie beispielsweise der postulierten Diaminoxidase, die für den Ringschluß der Necinbase verantwortlich ist. So könnte überprüft werden, ob die gesamte Biosynthese an einem Ort stattfindet oder ob verschiedene Zelltypen involviert sind. Im letzteren Fall wäre ein Transport der Zwischenprodukte zwischen den verschiedenen Zelltypen notwendig.

Eine Aufteilung der Biosynthese auf mindestens 4 verschiedene Zelltypen wurde für die Synthese des Monoterpen-Indol-Alkaloids (MIA) Vindolin in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) nachgewiesen. Hier zeigen sich zudem noch interessante Parallelen zur Lokalisation der HSS in *H. indicum*, da Teile der Biosynthese in der Epidermis der Blätter lokalisiert sind. Die an der Biosynthese beteiligten Enzyme Tryptophan Decarboxylase (TDC) und Strictosidin-Synthase (STR1) wurden durch Immunolokalisation und *in situ* Hybridisierung in der Epidermis von Blättern, Stengeln und Sepalen und Petalen der Knospe nachgewiesen. In der Wurzelspitze wurden die beiden Enzyme mit den gleichen Methoden im Grundmeristem und den sich daraus ausdifferenzierenden Rindenparenchymzellen sowie im Protoderm lokalisiert (St-Pierre et al., 1999). Spätere Enzyme der MIA-Biosynthese wie D4H (Deacetoxyvindolin 4-hydroxylase) und

DAT (Deacetylvindolin 4-*O*-acetyltransferase) wurden interessanterweise in spezifischen Idioblasten und Milchröhren von Blättern, Stengeln und Knospen detektiert, was einen Transport von Intermediaten zwischen diesen beiden Zelltypen erforderlich macht. In neueren Studien konnten weitere, ganz am Anfang der MIA-Biosynthese stehende Enzyme charakterisiert werden. Mit DXS (1-Desoxy-D-xylose 5-phosphat-Synthase), DXR (1-Desoxy-D-xylose 5-phosphat-Reduktoisomerase) und MECS (2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat-Synthase) konnten drei Enzyme des Rohmer-Wegs durch *in situ* Hybridisierung in den Zellen des Innenphloems in allen untersuchten oberirdischen Organen mit Ausnahme der Blüten und Früchte nachgewiesen werden (Burlat et al., 2004). Die Produkte des Rohmer-Wegs stellen Vorstufen für den weiteren Aufbau der MIA dar. In den gleichen Zellen wurden darüber hinaus Transkripte der Geraniol-10-hydroxylase, dem ersten spezifischen Enzym der MIA-Biosynthese gefunden. Somit ergibt sich für die Synthese des MIA Vindolin in *C. roseus* folgendes Szenario: Während in den Parenchymzellen des Innenphloems über den Rohmer Weg der Monoterpenkörper aufgebaut wird, erfolgt in den Zellen der Epidermis der Aufbau des zentralen Zwischenproduktes Strictosidin. In den Idioblasten und Milchröhren schließlich erfolgt der Abschluß der Biosynthese und die Akkumulation der toxischen Endprodukte.

Ebenfalls auf verschiedene Zelltypen aufgeteilt ist die Biosynthese der Tropan-Alkaloide (TA). Das Eingangsenzym der TA-Biosynthese Putrescin-*N*-Methyltransferase (PMT) wurde durch GUS-Reportergenanalysen im Perizykel junger Wurzeln von *Atropa belladonna* (Solanaceae) lokalisiert (Suzuki et al., 1999a). In der gleichen Pflanze konnte das letzte Enzym der Scopolamin-Biosynthese Hyoscyamin-6 $\beta$ -Hydroxylase (H6H) sowohl durch Immunolokalisation und *in situ* Hybridisierung als auch durch GUS-Reportergenanalysen ebenfalls im Perizykel der jungen Wurzel nachgewiesen werden (Suzuki et al., 1999b). Dabei wurden für die Immunolokalisation die gleichen Antikörper eingesetzt, mit denen bereits zuvor die H6H erfolgreich in den Perizykelzellen der jungen Wurzel von *Hyoscyamus niger* (Solanaceae) nachgewiesen werden konnte (Hashimoto et al., 1991). Aus der Lokalisation dieser beiden Enzyme im Perizykel ergeben sich weitere, interessante Parallelen zur Lokalisation der HSS in *C. officinale*, da in beiden Fällen die Expression mit dem Beginn des sekundären Dickenwachstums abgeschaltet wurde. Ebenso konnte die von Hashimoto et al. gemachte Beobachtung, wonach die Expression der H6H im Bereich austreibender Lateralwurzeln abgeschaltet war, für die HSS bei *C. officinale* bestätigt werden. Im Gegensatz zur H6H wurde die Tropinonreduktase I (TR I), die eine stereospezifische Reduktion in der Scopolamin-Biosynthese katalysiert, in

den Zellen der Endodermis und in mehreren Zellschichten im äußeren Bereich des Wurzelrindenparenchyms von *H. niger* nachgewiesen (Nakajima und Hashimoto, 1999). Die Biosynthese der TAs in den Wurzeln von *H. niger* und *A. belladonna* beginnt und endet somit in den Zellen des Perizykels, wobei mindestens ein dazwischenliegender Schritt in der Endodermis abläuft, was einen Transport der Intermediate zwischen diesen beiden Geweben notwendig macht.

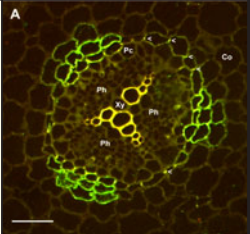
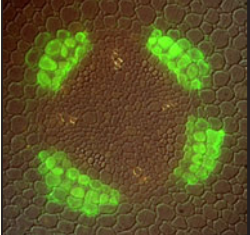
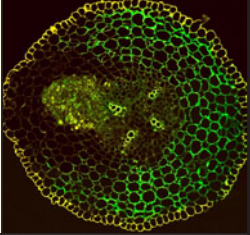
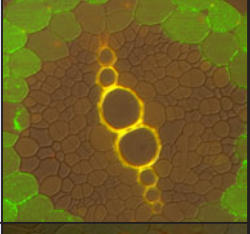
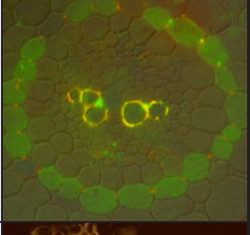
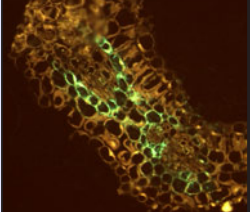
Die Biosynthese der Benzyloisochinolin-Alkaloide (BIAs) des Schlafmohns (*Papaver somniferum*, Papaveraceae) ist ein weiteres interessantes Beispiel für eine hochspezifische Kompartimentierung der an ihr beteiligten Enzyme und wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Das Eingangsenzym an der Schnittstelle zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel ist die Tyrosin/Dopa-Decarboxylase (*tydc*). Sie wird durch eine große Genfamilie kodiert (Facchini und De Luca, 1994). Transkripte von *tydc* konnten im Phloem von oberirdischen Organen der Pflanze nachgewiesen werden (Facchini und De Luca, 1995). Durch *in situ* Hybridisierung konnten darüber hinaus die Transkripte von drei an der BIA-Biosynthese beteiligten Enzyme in den Geleitzellen der Siebröhren des Phloems nachgewiesen werden (Bird et al., 2003). Da die zugehörigen Proteine jedoch durch Immunolokalisation in den Zellen der Siebröhren detektiert wurden, müssen die Enzyme zunächst von den Geleitzellen in die Siebröhren, die selbst auf Grund des Fehlens von Zellkern und Ribosomen nicht in der Lage sind, Proteinbiosynthese zu betreiben, transportiert werden. Für diesen Transport konnten bisher jedoch keine Hinweise in Form von Plasmodesmen oder Signalstrukturen der Enzyme gefunden werden. Ein weiterer Transport schließlich ist notwendig, um die Produkte in die Milchröhren zur Akkumulation zu überführen. Nach Bird et al. (2003) sind somit mindestens 3 Zelltypen an der Biosynthese der BIAs beteiligt. Während die Transkription und Translation der benötigten Enzyme in den Geleitzellen abläuft, findet die eigentliche Biosynthese in den Siebröhren statt. Die Speicherung der Alkaloide erfolgt dann letztlich in speziellen Milchröhren. Ein anderes Szenario zur Biosynthese der BIAs auf zellulärer Ebene wird von Weid et al. (2004) postuliert. In Immunolokalisationsstudien wurden 3 an der Biosynthese des Morphins beteiligte Enzyme in zwei unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen (Weid et al., 2004). Jeweils ein am Anfang und in der Mitte der Biosynthese stehendes Enzym wurden in Parenchymzellen des Phloems in direkter Nachbarschaft zu den Milchröhren detektiert. Das dritte Enzym, die Codeinonreduktase (COR) wurde überraschenderweise direkt in den Milchröhren nachgewiesen. Diese Ergebnisse implizieren eine Biosynthese der BIAs zunächst in den Parenchymzellen des Phloems. Danach muß ein Transport der

Intermediate in die Milchröhren erfolgen, wo die Biosynthese abgeschlossen wird und ihre Speicherung erfolgt.

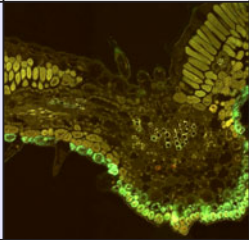
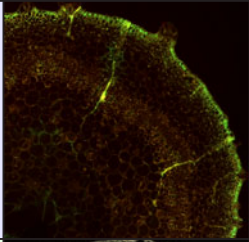
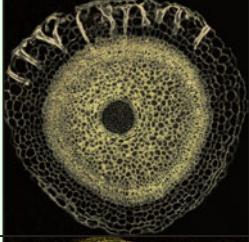

Die Biosynthese des BIA Berberin in *Thalictrum flavum* (Ranunculaceae) erfolgt sowohl räumlich als auch zeitlich getrennt von der Speicherung dieses Alkaloids mit antibakterieller Wirkung (Samanani et al., 2005). In der Wurzel konnten mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung die Transkripte von allen neun an der Biosynthese beteiligten Enzymen in der noch unreifen Endodermis und im Perizykel lokalisiert werden. Mit Einsetzen des sekundären Dickenwachstums konnte keine mRNA mehr nachgewiesen werden. Im Verlauf dieses Dickenwachstums der Wurzel wächst die Endodermis durch antiklinale Zellteilungen mit und bildet das Abschlußgewebe der Wurzel. Die Produkte der Biosynthese wurden in genau dieser reifen Endodermis nachgewiesen. Vor dem Hintergrund einer antibakteriellen Wirkung des Berberins macht die Speicherung in der Endodermis als zukünftiges Abschlußgewebe Sinn. Auch im Rhizom von *T. flavum* konnte diese Aufteilung beobachtet werden (Samanani et al., 2005). Während die Biosynthese im Protoderm von Blattprimordien stattfindet, erfolgt die Akkumulation der Produkte im Mark und im Cortex. Die Regulation dieser räumlichen und zeitlichen Trennung von Produktion und Speicherung ist ein weiteres Beispiel für die faszinierende Variabilität des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, die erst zu einem Bruchteil aufgeklärt und verstanden ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern unser Verständnis von diesen komplexen Zusammenhängen um eine weitere interessante Facette und bieten neue Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen.



| Art<br>(Familie)                                       | Organspezifische<br>Expression  | Zellspezifische<br>Expression   | Abb.  |
|--|---|---|---|
| <b><i>Senecio vernalis</i></b><br>(Asteraceae)         | Expression der HSS ausschließlich in den Wurzeln (Moll et al., 2002).   | <u>Wurzel:</u><br>Gruppen von spezifischen Zellen der Endodermis und des Rindenparenchym (Moll et al., 2002).                             |    |
| <b><i>Senecio jacobaea</i></b><br>(Asteraceae)         | Expression der HSS ausschließlich in den jungen, jährlich neu gebildeten Wurzeln.   | <u>Wurzel:</u><br>Gruppen von spezifischen Zellen der Endodermis und des Rindenparenchyms.  |    |
| <b><i>Eupatorium cannabinum</i></b><br>(Asteraceae)    | Expression der HSS nur in den jedes Jahr neu gebildeten Wurzeln in der ersten Jahreshälfte (Anke et al., 2004).                                   | <u>Wurzel:</u><br>Alle Zellen des Wurzelparenchyms mit Ausnahme der Endodermis (Anke et al., 2004).                                       |   |
| <b><i>Cynoglossum officinale</i></b><br>(Boraginaceae) | <u>Rosettenpflanze:</u><br>Expression nur in den Wurzeln.<br><u>Zweijährige Pflanze:</u><br>Expression nur in den jungen, neu gebildeten Wurzeln. | <u>Wurzel:</u><br>Zunächst nur die Zellen der Endodermis, in der voll ausdifferenzierten Wurzel Zellen der Endodermis und des Perizykels. |  |
| <b><i>Symphytum officinale</i></b><br>(Boraginaceae)   | Expression in den jungen, jährlich neu austreibenden Wurzeln und in den jungen Blättern eines Seitentriebes, der ausschließlich Knospen trägt.    | <u>Wurzel:</u><br>Zellen der Endodermis.  |  |
|  |   | <u>Junges Blatt:</u><br>Wahrscheinlich Zellen der Bündelscheide.  |  |

**Abbildung 4.2:** Vergleich der Expressionsmuster der HSS auf Gewebe- und zellulärer Ebene bereits untersuchter Vertreter aus den Familien der Asteraceae, Boraginaceae und Orchidaceae Teil 1.

| Art<br>(Familie)                                     | Organspezifische<br>Expression  | Zellspezifische<br>Expression   | Abb.  |
|--|---|---|---|
| <b><i>Heliotropium indicum</i></b><br>(Boraginaceae) | Expression der HSS im jungen Blatt, im jungen Sproß und in der Knospe.<br><br>Die Expression in der Knospe konnte noch nicht auf zellulärer Ebene bestätigt werden. | <u>Junges Blatt:</u><br>Zellen der unteren Epidermis mit Ausnahme von Haar- und Schließzellen.  |    |
|  |   | <u>Junger Sproß:</u><br>Zellen der Epidermis mit Ausnahme von Haar- und Schließzellen.  |    |
| <b><i>Phalaenopsis spec.</i></b><br>(Orchidaceae)    | Expression der HSS in den Luftwurzelspitzen und den Knospen (Anke et al., 2004).  | <u>Luftwurzelspitze:</u><br>Zellen des Grundmeristems und jungen Rindenparenchyms sowie des Protoderms (Anke et al., 2004).   |   |
|  |   | <u>Knospe:</u><br>Epidermis des Perigons, des Blütenstiels und des Fruchtknotens sowie in spezifischen Parenchymzellen des Blütenstiels, des Perigons, der Antherenkappe und des Trägers der Lippe (Anke et al., 2004). |  |

**Abbildung 4.3:** Vergleich der Expressionsmuster der HSS auf Gewebe- und zellulärer Ebene bereits untersuchter Vertreter aus den Familien der Asteraceae, Boraginaceae und Orchidaceae Teil 2. Der polyphyletische Ursprung der HSS spiegelt sich in der unterschiedlichen Expression im Gewebe wider. Er kann aber nur zum Teil als Erklärung für die hochspezifische zelluläre Expression der HSS dienen, da innerhalb der untersuchten Boraginaceen ebenfalls deutliche Unterschiede hinsichtlich der Expressionsmuster auf Gewebe- und zellulärer Ebene gefunden wurden, obwohl die HSS innerhalb dieser Familie monophyletisch entstanden ist.

## 4.2 Ausblick

Die bereits vorliegenden Daten zur Expression der HSS in PA-produzierenden Pflanzen konnten im Rahmen dieser Arbeit um die gewebespezifische und zelluläre Expression der HSS aus drei Vertretern der Boraginaceae (*C. officinale*, *S. officinale*, *H. indicum*) und einem Vertreter der Asteraceae (*S. jacobaea*) erweitert werden. Die Ergebnisse zeigen eine sehr differenzierte und jeweils individuell angepaßte Regulation der Expression der untersuchten HSS. Die neuen Daten bestätigen somit zum einen die Erwartungen aus früheren Untersuchungen vor dem Hintergrund eines polyphyletischen Ursprungs der HSS innerhalb der Angiospermen, erweitern sie jedoch darüber hinaus um die Erkenntnis, daß die Individualität des Expressionsmusters auch innerhalb einer Familie, in der die HSS nur einmal aus der DHS rekrutiert worden ist, gewahrt bleibt.

Mit der HSS ist erst ein Enzym der PA-Biosynthese eingehend hinsichtlich seines evolutionen Ursprungs untersucht worden. Gegenwärtige Arbeiten beschäftigen sich daher mit der Identifizierung, Isolierung und Klonierung weiterer Enzyme dieser Biosynthese. Im Visier sind dabei sowohl die der HSS folgenden Reaktionsschritte zum weiteren Aufbau der Necin-Base, als auch die bisher noch nicht mit molekularbiologischen Methoden untersuchte Biosynthese der Necin-Säure. Dabei zeichnet sich im ersten Fall die für den Ringschluß postulierte Diaminoxidase als sehr erfolgversprechend ab. Aber auch die am Aufbau der Necin-Säure der PAs vom Lycopsamin-Typ (s. Abb. 1.1) möglicherweise beteiligte Acetolactat-Synthase ist Gegenstand intensiver Untersuchungen. Durch die erfolgreiche Identifizierung, Isolierung und Klonierung zusätzlicher Enzyme sind z.B. weitere vergleichende Immunolokalisationsstudien möglich, um noch tiefere Erkenntnisse über die sehr komplexe Regulation der PA-Biosynthese auf zellulärer Ebene zu erhalten. Besonders spannend ist in diesem Zusammenhang die Klärung der Frage, ob alle Schritte der Biosynthese parallel in einem Gewebe lokalisiert sind oder ob ein Transport von Intermediaten zwischen unterschiedlichen Produktionsorten erfolgt.

Zusätzlich zu den immunologischen Methoden wird zur Zeit die *in situ* Hybridisierung in unserer Arbeitsgruppe etabliert, um Transkription und Expression der HSS auf zellulärer Ebene vergleichen zu können. Darüber hinaus kann diese sehr spezifische und sensitive Technik genutzt werden, um sehr früh Aussagen über die Lokalisation weiterer, an der Biosynthese beteiligter Enzyme treffen zu können, ohne auf Antikörper angewiesen zu sein, die erst im Anschluß einer Proteinreinigung und langwieriger Immunisierung zur Verfügung stehen. Im Anschluß an die Etablierung mit Hilfe der bereits bekannten

Daten zur Expression der HSS kann die Methode u.a. zur Lokalisation der mRNA der Diaminoxidase auf zellulärer Ebene eingesetzt werden, da bereits ausreichende Daten für den Bau spezifischer Sonden vorhanden sind.

Die erfolgreiche Lokalisation der HSS in den Zellen der Epidermis von jungen Blättern und Sprossen von *H. indicum* begünstigt den Einsatz der noch neuen, innovativen Laser-Capture-Microdissection (LCM)-Technik, um die Identifizierung weiterer an der PA-Biosynthese beteiligter Enzyme effektiver zu gestalten. Mit Hilfe von LCM ist es möglich, unter dem Mikroskop mit einem Laserstrahl hochpräzise einzelne Zellen und Zellverbände auszuschneiden und diese für weitere Untersuchungen aufzufangen. So kann ganz gezielt in den Epidermiszellen, in denen durch die Präsenz der HSS nachweislich ein Teil der PA-Biosynthese abläuft, durch molekularbiologische Methoden nach weiteren Enzymen gesucht werden. Die Epidermiszellen sind in diesem Zusammenhang besonders von Vorteil, da sie zum einen einfach unter dem Mikroskop zu identifizieren sind, und zum anderen als gesamte äußere Zellschicht verhältnismäßig einfach zu präparieren sind.

## 5 Zusammenfassung

1. Die HSS aus *C. officinale*, *S. officinale* und *H. indicum* wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit erfolgreich mit einem His-Tag-Motiv kloniert und standen für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung. Im Fall von *C. officinale* und *S. officinale* konnten diese Klone direkt für die heterologe Expression der HSS und anschließende Aufreinigung mit Hilfe der Metallaffinitätschromatographie eingesetzt werden. Die HSS aus *H. indicum* konnte nach einer Neuklonierung in gleicher Weise gewonnen und aufgearbeitet werden. Die gereinigte HSS wurde für die Gewinnung eines spezifischen Antikörpers benötigt. Um die für die Kontrollversuche zur Kreuzreaktivität benötigte DHS ebenfalls schnell und einfach aufzureinigen zu können, wurde an die bereits vorliegende DHS aus *C. officinale*, *S. officinale* und *H. indicum* mit Hilfe molekularbiologischer Methoden ein His-Tag-Motiv angefügt. Im Anschluß daran wurde die DHS analog der HSS heterolog exprimiert und in einem Schritt metallaffinitätschromatographisch bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt.
2. Mit der aufgereinigten HSS aus *C. officinale*, *S. officinale* und *H. indicum* konnte jeweils ein polyklonaler Antikörper in Kaninchen erzeugt und dieser im Anschluß daran mit Hilfe der Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Identität zwischen DHS und HSS lag bei allen drei untersuchten Vertretern aus der Familie der Boraginaceae mit durchschnittlich 74% auf Aminosäureebene auf einem relativ hohen Niveau. Die daraus resultierende Kreuzreaktivität des spezifischen HSS-Antikörpers mit der DHS wurde im Western Blot für alle drei Fälle bestätigt. Dabei wurde die HSS jeweils um den Faktor 4-5 empfindlicher detektiert als die DHS.
3. In Expressionsuntersuchungen an der zweijährigen Pflanze *C. officinale* konnte durch einen vergleichenden Western Blot gezeigt werden, daß die HSS in der einjährigen Pflanze in den Wurzeln und in der zweijährigen Pflanze nur in den jungen, weißen, jährlich neu austreibenden Wurzeln exprimiert wird.

4. In einem weiteren Western Blot konnte die HSS im Sproßapikalmeristem junger Keimlinge von *C. officinale* detektiert werden. Ob es sich dabei um eine lokal auf wenige Zellen im Bereich des Apikalmeristems beschränkte Expression der HSS handelt oder ob das Signal aus Resten der nicht vollständig abgetrennten Übergangszone zwischen Wurzel und Sproß resultiert, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.
5. Durch Immunolokalisationsstudien sowohl mit FITC als auch mit Immunogold und anschließendem Silver-Enhancement konnte gezeigt werden, daß die Expression der HSS auf zellulärer Ebene in den Wurzeln von *C. officinale* in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand der Wurzel reguliert wird. Während im noch undifferenzierten Bereich der jungen Wurzel direkt im Anschluß an die Kalyptra noch keine HSS detektierbar war, nahm die Expression über die beginnende Differenzierungszone mit einer markierten Endodermis bis hin zur voll ausdifferenzierten Wurzel mit Wurzelhaaren und austretenden Seitenwurzeln, wo die Markierung Endodermis und Perizykel umfaßte, zu .
6. In der mehrjährigen Staude *S. officinale* wurde die HSS durch Western Blot nur in den jungen, weißen und jährlich neu austreibenden Wurzeln nachgewiesen. Die alten Wurzeln sowie sämtliche untersuchten oberirdischen Organe ergaben zunächst kein Signal.
7. Überraschenderweise konnte in einem weiteren Western Blot die HSS zusätzlich in jungen Blättern von *S. officinale* detektiert werden. Bei diesen Blättern handelte es sich um die endständigen Blätter eines Seitentriebes, der ausschließlich Blütenknospen trägt. Nach dem Aufblühen sowie in vergleichbaren Seitentrieben ohne Blütenanlage konnte keine Expression der HSS mehr nachgewiesen werden. Erste noch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studien zur zellulären Lokalisation der HSS im jungen Blatt von *S. officinale* ergaben eine Expression in den Zellen der Bündelscheide.
8. In den Wurzeln von *S. officinale* wurde die HSS durch Immunolokalisationsstudien (FITC und Immunogold mit anschließendem Silver-Enhancement) in den Zellen der Endodermis lokalisiert.

- 
9. In einem vergleichenden Western Blot verschiedener Gewebe des mehrjährigen Strauches *H. indicum* wurde ein Vorkommen der HSS in den jungen Blättern, im jungen Sproß und in der Knospe nachgewiesen. In einem weiteren Western Blot konnte zusätzlich belegt werden, daß die Stärke der Expression der HSS in den Blättern von *H. indicum* abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstand ist. Die stärkste Expression zeigten dabei die ganz jungen Blätter. Mit zunehmender Größe der Blätter nahm die Expression ab, bis sie ab einer Blattgröße von ca. 6 cm Länge nicht mehr nachweisbar war.
  10. In anschließenden Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression der HSS (FITC und Immunogold mit Silver-Enhancement) wurde die HSS in der unteren Epidermis von jungen Blättern lokalisiert. In den Blattstielen und im jungen Sproß konnte sie ebenfalls in der Epidermis nachgewiesen werden. Die in direkter Nachbarschaft zu den markierten Epidermiszellen vorkommenden Haar- und Schließzellen zeigten keine HSS-Expression.
  11. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte im jungen Sproß auf subzellulärer Ebene bestätigt werden, daß die Expression der HSS auf die Zellen der Epidermis beschränkt ist. Darüber hinaus konnte die HSS auch für *H. indicum* als ein cytosolisches Protein charakterisiert werden.
  12. Die DHS und HSS aus *S. jacobaea* wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit erfolgreich mit einem His-Tag-Motiv kloniert. Die entsprechenden Klone wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt, so daß gleich mit der Expression in *E. coli* begonnen werden konnte. Die Aufreinigung bis zu apparenten Homogenität erfolgte anschließend in einem Schritt mit Hilfe der Metallaffinitätschromatographie.
  13. Mit der aufgereinigten HSS konnte ein spezifischer, polyklonaler Antikörper gewonnen werden, der anschließend durch Affinitätschromatographie aufgereinigt wurde. Die erwartete Kreuzreaktivität des spezifischen HSS-Antikörpers mit der DHS wurde im Western Blot bestätigt. Während die DHS erst ab einer Konzentration von 10 ng erkannt wurde, konnte die HSS bereits ab einer Konzentration von 2,5 ng nachgewiesen werden.

14. Das Expressionsmuster der HSS in *S. jacobaea* wurde mit Hilfe des Western Blot analysiert. In der mehrjährigen Staude *S. jacobaea* wurde die HSS ausschließlich in den jungen, jährlich neu austreibenden Wurzeln exprimiert.
15. Anschließende Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der HSS (AlexaFluor®488 und Immunogold mit Silver-Enhancement) ergaben eine Expression der HSS in distinkten Zellgruppen bestehend aus Zellen der Endodermis und 2-3 Zellschichten der angrenzenden Parenchymzellen. Diese Zellverbände lagen dem Phloem gegenüber. Im Bereich des Xylems war keine Markierung der Zellen zu beobachten.
16. Mit Hilfe von Unterfütterungsexperimenten wurde die Spezifität aller Immunomarkierungen eindeutig nachgewiesen.
17. In Proteinextrakten aus den Wurzeln von *C. officinale*, *S. officinale* und *S. jacobaea* wurde ein Abbau der HSS beobachtet, der eine Aufspaltung der HSS in zwei Fragmente von ca. 26 kDa und ca. 18 kDa ergab. Als mögliche Ursache wurde die Kontaminierung mit einer unbekannten Protease durch die den Wurzeln anhaftende Erde identifiziert. In durchgeführten Hemmversuchen konnte die Aktivität der Protease durch den Zusatz des Proteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) gehemmt und eine Degradierung der HSS reproduzierbar verhindert werden.



## Literaturverzeichnis

- Anke, S.** (2004b). Molekularbiologische und immunologische Methoden zur gewebe- und zellspezifischen Lokalisation der Homospermidin-Synthase, des Eingangsenzym der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese, in *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae) und *Phalaenopsis* Species (Orchidaceae). Dissertation, Tu-Braunschweig.
- Anke, S., Niemuller, D., Moll, S., Hänsch, R. und Ober, D.** (2004). Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. *Plant Physiology*, **136**, 4037–47.
- Beerhues, L., Robenek, H. und Wiermann, R.** (1988). Chalcone synthases from spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Planta*, **173**, 544–553.
- Bird, D. A., Franceschi, V. R. und Facchini, P. J.** (2003). A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell*, **15**, 2626–35.
- Birecka, H. und Catalfamo, J.** (1982). Incorporation of assimilated carbon into aminoalcohols of *Heliotropium spathulatum*. *Phytochemistry*, **21**, 2645–2651.
- Boppré, M.** (1986). Insect pharmacophagously utilizing defensive plant chemicals (pyrrolizidine alkaloids). *Naturwissenschaften*, **73**, 17–26.
- Boppré, M.** (1995). Pharmakophagie: Drogen, Sex und Schmetterlinge. *Biologie in unserer Zeit*, **25**, 8–17.
- Böttcher, F., Adolph, R. D. und Hartmann, T.** (1993). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, **32**, 679–689.
- Böttcher, F., Ober, D. und Hartmann, T.** (1994). Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids: Putrescine and spermidine are essential substrates of enzymatic homospermidine formation. *Canadian Journal of Chemistry*, **72**, 80–85.

- Burlat, V., Oudin, A., Courtois, M., Rideau, M. und St-Pierre, B.** (2004). Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *Plant Journal*, **38**, 131–41.
- Cheeke, P. R.** (1988). Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Animal Science*, **66**, 2343–50.
- Deus-Neumann, B. und Zenk, M. H.** (1984). A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. *Planta*, **162**, 250–260.
- Deus-Neumann, B. und Zenk, M. H.** (1986). Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion-trap mechanism. *Planta*, **167**, 44–53.
- Ehmke, A., von Borstel, K. und Hartmann, T.** (1988). Alkaloid *N*-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris*. *Planta*, **176**, 83–90.
- Esau, K.**, *Anatomy of Seed Plants*, 2nd Ed. (John Wiley and Sons, 1977), 2. Auflage.
- Facchini, P. J. und De Luca, V.** (1994). Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 26684–90.
- Facchini, P. J. und De Luca, V.** (1995). Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell*, **7**, 1811–1821.
- Fowler, M. E.** (1983). Plant poisoning in free-living wild animals: a review. *Journal of Wildlife Diseases*, **19**, 34–43.
- Frei, H., Luthy, J., Brauchli, J., Zweifel, U., Wurgler, F. E. und Schlatter, C.** (1992). Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemico-Biological Interactions*, **83**, 1–22.
- Frölich, C.** (1996). Vorkommen, Verteilung und Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden in Boraginaceae und Orchidaceae. Dissertation, TU Braunschweig.

- Galston, A. W. und Kaur-Sawhney, R.**, Polyamines as endogenous growth regulators. In P. J. Davies, Herausgeber, *Plant hormones* (Kluwer Academic Publisher, Amsterdam, 1995), Seiten 158–178.
- Graser, G. und Hartmann, T.** (2000). Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. *Planta*, **211**, 239–245.
- Harborne, J. B.** (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Product Reports*, **18**, 361–379.
- Harlow, E. und Lane, D.**, *Antibodies: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).
- Hartmann, T.** (1985). Prinzipien des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. *Plant Systematics and Evolution*, **150**, 15–34.
- Hartmann, T.** (1987). Warum gibt es so viele Arzneipflanzen? Zur Rolle des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. *Deutsche Apotheker Zeitung*, **127**, 2523–2527.
- Hartmann, T.**, *Senecio* ssp. : Biochemistry of the formation of pyrrolizidine alkaloids in root cultures. In Y. P. S. Bajaj, Herausgeber, *Medicinal and Aromatic Plants* (Springer, Berlin, Heidelberg, 1994), Band VI von *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Seiten 339–355. Vol. 26 Auflage.
- Hartmann, T.** (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: A mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **80**, 177–188.
- Hartmann, T. und Dierich, B.** (1998). Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: Biological need or coincidence? *Planta*, **206**, 443–451.
- Hartmann, T., Ehmke, A., Eilert, U., von Borstel, K. und Theuring, C.** (1989). Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in *Senecio vulgaris* L. *Planta*, **177**, 98–107.
- Hartmann, T. und Ober, D.**, Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. In *Topics in Current Chemistry* (Springer, 2000), Band 209, Seiten 207–243.

- Hartmann, T., Sander, H., Adolph, R. D. und Toppel, G.** (1988). Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Planta*, **175**, 82–90.
- Hartmann, T. und Witte, L.**, Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. In S. W. Pelletier, Herausgeber, *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* (Pergamon Press, 1995), Band 9, Seiten 155–233.
- Hartmann, T. und Zimmer, M.** (1986). Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *Senecio* species. *Journal of Plant Physiology*, **122**, 67–80.
- Hashimoto, T., Hayashi, A., Amano, Y., Kohno, J., Iwanari, H., Usuda, S. und Yamada, Y.** (1991). Hyoscyamine 6 b-hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 4648–53.
- Haslam, E.** (1986). Secondary metabolism - facts and fiction. *Natural Product Reports*, **3**, 217–249.
- Hochuli, E., Döbeli, H. und Schacher, A.** (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography*, **411**, 177–184.
- Hodgson, E.**, Microsomal mono-oxygenases. In G. A. Kerkut und L. I. Gilbert, Herausgeber, *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (Pergamon Press, Oxford, 1985), Band 11: Pharmacology, Seiten 225–321.
- Huan, J.-Y., Miranda, C. L., Buhler, D. R. und Cheeke, P. R.** (1998a). Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. *Toxicology Letters*, **99**, 127–37.
- Huan, J.-Y., Miranda, C. L., Buhler, D. R. und Cheeke, P. R.** (1998b). The roles of cyp3a and cyp2b isoforms in hepatic bioactivation and detoxification of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in sheep and hamsters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **151**, 229–35.

- Jenett-Siems, K., Schimming, T., Kaloga, M., Eich, E., Siems, K., Gupta, M. P., Witte, L. und Hartmann, T. (1998). Phytochemistry and chemotaxonomy of the convolvulaceae: Pyrrolizidine alkaloids of *Ipomoea hederifolia* and related species. *Phytochemistry*, **47**, 1551–1560.
- Kang, H. A. und Hershey, J. W. B. (1994). Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 3934–3940.
- Khan, H. und Robins, D. J. (1985). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis of <sup>14</sup>C-labelled homospermidines and their incorporation into retronecine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, Seiten 819–824.
- Lindigkeit, R., Biller, A., Buch, M., Schiebel, H. M., Boppré, M. und Hartmann, T. (1997). The two faces of pyrrolizidine alkaloids: The role of the tertiary amine and its *N*-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *European Journal of Biochemistry*, **245**, 626–636.
- Luckner, M., *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals* (Gustav Fischer, Jena, 1990), 3 Auflage.
- Mattocks, A. R., *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids* (Academic Press, London, New York, 1986).
- Miranda, C. L., Chung, W., Reed, R. E., Zhao, X., Henderson, M. C., Wang, J. L., Williams, D. E. und Buhler, D. R. (1991). Flavin-containing monooxygenase: A major detoxifying enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea pig tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **178**, 546–552.
- Moll, S. (2002). Lokalisierung der Homospermidinsynthase, dem ersten spezifischen Enzym der Pyrrolizidinalkaloidbiosynthese in den Wurzeln von *Senecio vernalis*. Dissertation, TU Braunschweig.
- Moll, S., Anke, S., Kahmann, U., Hänsch, R., Hartmann, T. und Ober, D. (2002). Cell-specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidine alkaloid pathway in *Senecio vernalis*, in comparison with its ancestor, deoxyhypusine synthase. *Plant Physiology*, **130**, 47–57.

- Molyneux, R. J., Campbell, B. C. und Dreyer, D. L.** (1990). Honeydew analysis for detecting phloem transport of plant natural products. *Journal of Chemical Ecology*, **16**, 1899–1909.
- Mothes, K.** (1955). Physiology of alkaloids. *Annual Review of Plant Physiology*, **6**, 393–432.
- Nakajima, K. und Hashimoto, T.** (1999). Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns. *Plant and Cell Physiology*, **40**, 1099–1107.
- Nowacki, E. und Byerrum, R. U.** (1962). A study on the biosynthesis of the *Crotalaria* alkaloids. *Life Sciences*, **5**, 157–161.
- Nurhayati, N. N.** (2004). Identification, Molecular Cloning and Characterisation of Homospermidine Synthase and Deoxyhypusine Synthase from *Phalaenopsis* and *Crotalaria* Species. Dissertation, TU Braunschweig.
- Ober, D.** (1997). Strategien zur immunologischen und molekularbiologischen Untersuchung der Homospermidin-Synthase, dem Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese. Dissertation, TU Braunschweig.
- Ober, D.**, Chemical ecology of alkaloids exemplified with the pyrrolizidines. In e. J. T. Romeo et al., Herausgeber, *Recent Advances in Phytochemistry* (Pergamon, Amsterdam, 2003), Band 37, Seiten 203–230.
- Ober, D.** (2005). Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, **10**, 444–9.
- Ober, D., Gibas, L., Witte, L. und Hartmann, T.** (2003a). Evidence for general occurrence of homospermidine in plants and its supposed origin as by-product of deoxyhypusine synthase. *Phytochemistry*, **62**, 339–44.
- Ober, D., Harms, R., Witte, L. und Hartmann, T.** (2003b). Molecular evolution by change of function: alkaloid-specific homospermidine synthase retained all properties of deoxyhypusine synthase except binding the eif5a precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 12805–12812.

- Ober, D. und Hartmann, T.** (1999a). Deoxyhypusine synthase from tobacco: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of an enzyme with extended substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 32040–32047.
- Ober, D. und Hartmann, T.** (1999b). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 14777–14782.
- Ober, D. und Hartmann, T.** (2000). Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Molecular Biology*, **44**, 445–450.
- Ober, D., Tholl, D., Martin, W. und Hartmann, T.** (1996). Homospermidine synthase of *Rhodospseudomonas viridis*: Substrate specificity and effects of the heterologously expressed enzyme on polyamine metabolism of *Escherichia coli*. *Journal of General and Applied Microbiology*, **42**, 411–419.
- Park, M. H., Joe, Y. A. und Kang, K. R.** (1998). Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 1677–1683.
- Park, M. H., Lee, Y. B. und Joe, Y. A.** (1997). Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biological Signals*, **6**, 115–123.
- Pichersky, E. und Gang, D. R.** (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, **5**, 439–445.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G.** (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598–599.
- Rana, J. und Robins, D. J.** (1983). Intact incorporation of [1,9-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-homospermidine into retronecine. *Journal of Chemical Research, Synopses*, Seiten 146–147.
- Reimann, A.** (2007). Molekularbiologische Untersuchungen zur Phylogenie der HSS, dem Eingangsenzym der Pyyrolizidin-Alkaloid-Biosynthese, in verschiedenen Vertretern der Boraginaceae. Dissertation, TU Braunschweig.

- Reimann, A., Nurhayati, N., Backenköhler, A. und Ober, D.** (2004). Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. *Plant Cell*, **16**, 2772–84.
- Robins, D. J.** (1989). Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. *Chemical Society reviews*, **18**, 375–408.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J. und Studier, F. W.** (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, **56**, 125–35.
- Rosorius, O., Reichart, B., Kraetzer, F., Heger, P., Dabauvalle, M. C. und Hauber, J.** (1999). Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *Journal of Cell Science*, **112**, 2369–2380.
- Samanani, N., Park, S.-U. und Facchini, P. J.** (2005). Cell Type-Specific Localization of Transcripts Encoding Nine Consecutive Enzymes Involved in Protoberberine Alkaloid Biosynthesis. *Plant Cell*, **17**, 915–926.
- Sander, H. und Hartmann, T.** (1989). Site of synthesis, metabolism and translocation of senecionine *N*-oxide in cultured roots of *Senecio erucifolius*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **18**, 19–32.
- Srivenugopal, K. S. und Adiga, P. R.** (1980). Enzymatic synthesis of sym-homosperrmidine in *Lathyrus sativus* (grass pea) seedlings. *Biochemical Journal*, **190**, 461–464.
- St-Pierre, B., Vazquez-Flota, F. A. und De Luca, V.** (1999). Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell*, **11**, 887–900.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, **189**, 113–30.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, **185**, 60–89.



- Suzuki, K., Yamada, Y. und Hashimoto, T.** (1999a). Expression of *Atropa belladonna* putrescine *N*-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant Cell Physiol*, **40**, 289–97.
- Suzuki, K. I., Yun, D. J., Chen, X. Y., Yamada, Y. und Hashimoto, T.** (1999b). An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6b-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. *Plant Molecular Biology*, **40**, 141–152.
- Swain, T.** (1977). Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology*, **28**, 479–501.
- Tholl, D., Ober, D., Martin, W., Kellermann, J. und Hartmann, T.** (1996). Purification, molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of homospermidine synthase from *Rhodopseudomonas viridis*. *European Journal of Biochemistry*, **240**, 373–379.
- Toppel, G., Witte, L., Riebesehl, B., von Borstel, K. und Hartmann, T.** (1987). Alkaloid patterns and biosynthetic capacity of root cultures from some pyrrolizidine alkaloid producing *Senecio* species. *Plant Cell Reports*, **6**, 466–469.
- Valentini, S. R., Casolari, J. M., Oliveira, C. C., Silver, P. A. und McBride, A. E.** (2002). Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics*, **160**, 393–405.
- Van Dam, N. M., Vuister, L. W. M., Bergshoeff, C., De Vos, H. und Van der Meijden, E.** (1995a). The "Raison D'Etre" of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: Deterrent effects against generalist herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, **21**, 507–523.
- Van Dam, N. M., Witte, L., Theuring, C. und Hartmann, T.** (1995b). Distribution, biosynthesis and turnover of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*. *Phytochemistry*, **39**, 287–292.
- Weid, M., Ziegler, J. und Kutchan, T. M.** (2004). The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 13957–62.

- Witte, L., Ehmke, A. und Hartmann, T.** (1990). Interspecific flow of pyrrolizidine alkaloids; from plants via aphids to ladybirds. *Naturwissenschaften*, **77**, 540–543.

## Lebenslauf

|                          |  |                            |
|--------------------------|--|----------------------------|
| <b>Persönliche Daten</b> | Daniel Niemüller<br>Enzianweg 4<br>38108 Braunschweig<br>geboren am 10.07.1975 in Osterholz-Scharmbeck<br>deutsche Staatsbürgerschaft<br>nicht verheiratet |                            |
| <b>Schulbildung</b>      | Grundschule, Orientierungsstufe,<br>Copernicus Gymnasium Lönigen<br>Abschluß: Abitur   | 08.82-07.95                |
| <b>Studium</b>           | TU-Braunschweig, Studium der Pharmazie<br>Praktikum am Institut für Pharm. Biologie<br>der TU-Braunschweig   | 10.96-05.01<br>06.01-11.01 |
|                          | Praktikum in der Löwenapotheke Vechelde  | 12.01-05.02                |
|                          | Approbation als Apotheker  | seit 07.02                 |
| <b>Berufstätigkeit</b>   | Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut<br>für Pharm. Biologie der TU-Braunschweig  | 07.02-12.05                |
|                          | Abschließende Arbeiten an der Dissertation   | 01.06-06.06                |
|                          | Beschäftigung in der Packhof Apotheke, Braunschweig  | 07.06-09.06                |
|                          | Beschäftigung bei G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG,<br>Hohenlockstedt   | seit 10.06                 |